



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**SUZETE CARVALHO LANDULFO LUZ**

**TERAPIA FOTODINÂMICA: EFETIVIDADE E MECANISMOS  
MOLECULARES DA AÇÃO DA CURCUMINA COMO  
FOTOSENSIBILIZADOR FRENTE A BIOFILME DE *Pseudomonas  
aeruginosa***

Vitória da Conquista, BA  
2019

**SUZETE CARVALHO LANDULFO LUZ**

**TERAPIA FOTODINÂMICA: EFETIVIDADE E MECANISMOS  
MOLECULARES DA AÇÃO DA CURCUMINA COMO  
FOTOSENSIBILIZADOR FRENTE A BIOFILMES DE *Pseudomonas  
aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito  
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa

Vitória da Conquista, BA  
2019

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Luz, Suzete Carvalho Landulfo

Terapia fotodinâmica: efetividade e mecanismos moleculares da ação da curcumina como fotossensibilizador frente a biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* / Suzete Carvalho Landulfo Luz - 2019.

94 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.

1. Fotoquimioterapia. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Curcumina. I Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Rosa, Luciano Pereira III. Título.

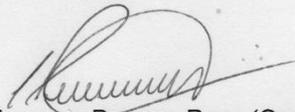
CDU 561.23

Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858

**SUZETE CARVALHO LANDULFO LUZ**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
BIOCIÊNCIAS E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

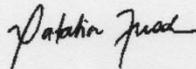
VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, 03/06/2019.



PROF. DR. LUCIANO PEREIRA ROSA (ORIENTADOR)  
(UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)



PROF.ª DR.ª FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA (EXAMINADORA)  
(UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)



PROF.ª DR.ª NATÁLIA MAYUMI INADA (EXAMINADORA)  
(UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

A

Deus, meu Senhor, que diante de minhas escolhas e lutas sempre me entregou vitória e honra. Louvado seja o Senhor, sempre!!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que na Sua infinita misericórdia continua a derramar vinho novo em minha vida, mesmo eu não sendo um odre completamente novo.

À minha família. Aos meus pais, que de forma tão generosa e sábia me ensinaram que a verdadeira conquista dos nossos objetivos é fruto de trabalho árduo, dedicação, respeito e muito amor. Aos meus irmãos e sobrinha pela credibilidade que depositam em mim, em especial à minha irmã Andreia que, com dedicação e amor sem limites, assumiu meu papel quando não pude cuidar de minha filha e de nossos pais.

Ao meu amado esposo Antônio, o grande homem que tão bem escolhi para partilhar minha vida. Parceiro que não mede esforços para que meus sonhos se concretizem, que me faz sentir a mulher mais admirada e amada do mundo. Obrigada pelo amor, confiança e apoio incondicionais. Te amo para sempre!!!

À minha amadíssima filha Maria Antônia, o maior presente que já recebi de Deus. O ser mais incrível e lindo do mundo, que mesmo tão pequena não para de me ensinar sobre a vida. Costumo dizer que o mestrado me trouxe dois grandes aprendizados, um acadêmico, como era de se esperar e outro de vida. As necessidades da infância de Maria Antônia e a saúde de minha mãe me ensinaram, com muito amor e resiliência, que o tempo das coisas é diferente do meu e que eu precisava ser sábia para não sofrer por isso demasiadamente.

Ao meu orientador Prof. Luciano Rosa, pelos conhecimentos partilhados, pelo respeito e sua incrível e intocável serenidade. Estas são características de quem detém verdadeiramente o conhecimento, nunca dão margem à prepotência ou arrogância. Você é um professor na essência.

À Fernanda Alves, Natália Mayumi e Ievgeniia Iemark por todo profissionalismo, disponibilidade e carinho com que me receberam no Instituto de Física São Carlos-USP para a realização de parte da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francine Cristina e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natália Inada que tão gentilmente disponibilizaram tempo e o vasto conhecimento que possuem para contribuir com esta dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biociências, pela competência, dedicação e por nos inspirar como modelos a serem seguidos.

Aos colegas de disciplinas do mestrado e de Congresso, Deivison, Fabrícia, Igor e Ângela que apesar do curto tempo de convivência se tornaram grandes amigos.

Aos meus colegas de turma de mestrado, muito obrigada pelo amor, carinho, encorajamento que destinaram a mim. Em um dado momento da pós-graduação, o tempo que passávamos juntos superava o tempo com nossas famílias e isto foi muito importante para a consolidação de nossos laços de amizade que desejo serem eternos.

Aos alunos de iniciação científica Ana Meirellen e Gabriel Pinto pela disponibilidade em me auxiliar ao longo dos experimentos.

À técnica de laboratório Janeide, por sua dedicação, colaboração e esforços sem limites para nos ajudar a transpor os obstáculos que encontramos ao longo da pesquisa.

À secretária do colegiado Lina Borba, por toda competência, disponibilidade e sensibilidade. Precisamos de mais “Linhas” no mundo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB, pelo apoio e investimento em minha qualificação acadêmica.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“Só o conhecimento traz o poder.” (Sigmund Freud)

LUZ, Suzete Carvalho Landulfo. Terapia Fotodinâmica: Efetividade e mecanismos moleculares da ação da curcumina como fotossensibilizador frente a biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. 94 f. il. 2019. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa com alta capacidade de formar biofilmes densos, uma estrutura complexa que predispõe o desenvolvimento de fenótipos resistentes a antibióticos, contribuindo para que as infecções relacionadas aos cuidados de saúde se tornem um grave problema de saúde pública mundial. Trata-se de uma pesquisa *in vitro*, do tipo experimental cujo objetivo foi avaliar a efetividade antimicrobiana e os mecanismos moleculares da ação da curcumina nas concentrações de 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml irradiadas por luz LED azul 450 nm, nas doses de energia de 3,24 J/cm<sup>2</sup>, 5,4 J/cm<sup>2</sup> e 10,8 J/cm<sup>2</sup>, frente a biofilmes monoespécie de *Pseudomonas aeruginosa*. Os grupos experimentais tratados com PDT tiveram seus resultados comparados entre si, com grupo controle negativo (sem tratamento) e grupos controle positivos (LED e curcumina, isoladamente), totalizando 16 grupos experimentais. Para avaliar o efeito antimicrobiano, a contagem de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) foi transformada em Log<sub>10</sub>, checados os pressupostos de normalidade e homogeneidade, com a análise estatística realizada por meio de Anova (p valor < 0,05) e Kruskal-Wallis (p valor < 0,05), com pós-teste de Bonferroni e Dunn, respectivamente. O estudo da estrutura do biofilme foi realizado a partir de imagens geradas por microscopia confocal de varredura a LASER (CSLM) e, por microespectroscopia Raman, foram avaliados os mecanismos moleculares da ação da curcumina através dos picos observados no espectro. Os resultados demonstraram uma ação centrada no efeito disruptivo do biofilme, além de um efeito antimicrobiano em todos os protocolos de PDT, com melhores resultados observados nos protocolos com maior concentração de fotossensibilizador e dose de energia mais alta. A PDT mediada por curcumina avaliada nesta pesquisa mostrou-se eficaz não só em reduzir em uma única sessão, 1,3 log<sub>10</sub> na viabilidade de células bacterianas, correspondendo a uma redução percentual de mais de 90% na contagem de UFC/ml, mas principalmente pelo seu efeito antibiofilme, podendo possivelmente ser utilizada como potencializadora da ação de antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica. Curcumina. LED. Biofilme. Disruptura. *Pseudomonas aeruginosa*.

LUZ, Suzete Carvalho Landulfo. Photodynamic Therapy: Effectiveness and molecular mechanisms of curcumin action as a photosensitizer against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. 94 p. il. 2019. Dissertation (Master's degree) – Multidisciplinary Institute on Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium with high capacity to form dense biofilm, a complex structure which predisposes to development of antibiotic resistant phenotypes, contributing to healthcare-related infections becoming a serious worldwide public health problem. This is an *in vitro* experimental study, which has aimed to evaluate the antimicrobial effectiveness and molecular mechanisms of curcumin action at concentrations of 5 µg / ml, 20 µg / ml and 40 µg / ml irradiated by blue LED light 450 nm at energy doses of 3.24 J / cm<sup>2</sup>, 5.4 J / cm<sup>2</sup> and 10.8 J / cm<sup>2</sup>, against to *Pseudomonas aeruginosa* monospecies biofilms. Experimental groups treated with PDT (Photodynamic Therapy) had had their results compared among them with negative control group (without treatment) and positive control groups (LED and curcumin, alone), totaling 16 experimental groups. To evaluate the antimicrobial effect, the count of colony forming units per ml (CFU / ml) has been transformed to Log<sub>10</sub>, checking the assumptions of normality and homogeneity, with statistical analysis performed by Anova (p value <0.05) and Kruskal-Wallis (p value <0.05), with Bonferroni and Dunn post-test, respectively. The study of biofilm structure was based on images generated by LASER confocal scanning microscopy (CSLM) and, by Raman microspectroscopy, molecular mechanisms of curcumin action through peaks observed in spectrum have been evaluated. The results have demonstrated an action centered on the disruptive effect of biofilm, as well as an antimicrobial effect in all PDT protocols, with more expressive results observed in protocols with higher photosensitizer concentration and higher energy dose. Curcumin-mediated PDT evaluated in that study has proved effective not only in reducing, in a single session, 1.3 log<sub>10</sub> in bacterial cell viability, corresponding to a percentage reduction of more than 90% in CFU / ml count, but mainly due to its antibiofilm effect and may possibly be used as a potentiator of antimicrobial action.

**Keywords:** Photodynamic Therapy. Curcumin. LED. Biofilm. Disruption. *Pseudomonas aeruginosa*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
Figura	2	Estágios de formação do biofilme.....	30
Figura	3	Diagrama de Jablonski.....	34
Figura	4	Tautomerismo da curcumina em condições fisiológicas.....	38
Quadro	1	Grupos experimentais delineados para a pesquisa.....	45
Gráfico	1	Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 5 µg/ml de curcumina.....	77
Gráfico	2	Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 20 µg/ml de curcumina.....	78
Gráfico	3	Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 40 µg/ml de curcumina.....	79
Gráfico	4	Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre todos os grupos experimentais de PDT nas diferentes concentrações de curcumina irradiadas por distintas doses de energia.....	80
Figura	5	Sequência de imagens geradas por CSLM para avaliação da estrutura do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> antes e após aPDT.....	81
Figura	6	Autofluorescência e espectros Raman do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> antes e após aPDT.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/ml	Micrograma por mililitros
µm	Micrômetro
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singleto
5- ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AHLs	Lactona N-acil homoserina
aPDT	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
ATCC	American Type Culture Collection
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
BHI	Brain Heart Infusion
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	Fórmula molecular da curcumina
c-AMP	Adenosina- 3'-5' monofosfato cíclico
c-di-GMP	Guanosina- 3'-5' monofosfato cíclica dimérica
C-O-C	Ligações glicosídicas simétricas
CSLM	Microscopia confocal de varredura a LASER
CUR	Curcumina
DL-PDT	Daylight- Photodynamic Therapy
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Ácido desoxirribonuclease
e-DNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Exopolissacarídeos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EXO - S	Gene da exoenzima S
EXO - T	Gene da exoenzima T
EXO - U	Gene da exoenzima U
EXO - Y	Gene da exoenzima Y
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação Osvaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
GC -	Grupo controle negativo

GC +	Grupo controle positivo
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
INCQS	Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
LASER	Light Amplification Stimulated Emission of Radiation
LED	Light Emitting Diode
Log <sub>10</sub>	Logaritmo de dez
Mb	Milhares de pares de bases
MDR-PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente
Min	Minutos
Mm	Milímetros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a Meticilina
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatts por centímetro quadrado
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanômetro
° C	Graus Celsius
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
OD	Densidade óptica
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDR-PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> pan-resistente
PDT	Photodynamic Therapy
PEL	Polissacarídeo originado de película
PES	Polietersulfona hidrofílica
pKa	Potencial hidrogeniônico do ácido
PSL	Locus de síntese de polissacarídeo
QS	Quórum sensing
RAAQ	Resina acrílica quimicamente ativada
r-RNA	Ácido ribonucleico ribossômico
S	Segundos
T1SS	Sistema de secreção de moléculas do tipo I

T2SS	Sistema de secreção de moléculas do tipo II
T3SS	Sistema de secreção de moléculas do tipo III
UFC/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	World Health Organization
XDR-PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> extensivamente resistente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E AS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS.....	20
2.2	CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>P. aeruginosa</i> .....	22
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	23
<b>2.3.1</b>	<b>Fatores de virulência associados à bactéria</b> .....	24
<b>2.3.2</b>	<b>Fatores de virulência secretados</b> .....	25
2.4	BIOFILMES BACTERIANOS.....	28
2.5	TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT).....	31
<b>2.5.1</b>	<b>Mecanismos de ação da aPDT</b> .....	32
<b>2.5.2</b>	<b>Fotossensibilizador</b> .....	34
2.5.2.1	<i>Curcumina</i> como fotossensibilizador.....	37
2.6	FONTES DE LUZ.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
3.1	OBJETIVO GERAL .....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA E LOCAL DE ESTUDO.....	45
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
4.3	CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	46
4.4	ATIVAÇÃO BACTERIANA.....	47
4.5	CULTIVO BACTERIANO E FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	47
4.6	PREPARO DO FOTOSSENSIBILIZADOR.....	48
4.7	PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO.....	49
4.8	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	49
4.9	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	50
4.10	MICROESPECTROSCOPIA RAMAN.....	51
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Infecção hospitalar ou infecção relacionada aos cuidados de saúde como é referida atualmente representa um grave problema de saúde pública mundial dada sua alta taxa de morbimortalidade, complexos mecanismos de resistência antimicrobiana e elevados custos de saúde. Estudos apontam que a incidência destas infecções é de 4-7% em países desenvolvidos como Estados Unidos e algumas nações europeias, 5-10% na maioria dos países em desenvolvimento, atingindo 25% em países da Ásia, como a Índia. (ALLEGIANZI et al, 2011; ESPÓSITO e De SIMONE, 2017; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2013; MAGILL et al, 2014; TAJ et al, 2018).

Neste cenário, vem ganhando destaque *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, oportunista, altamente aderente em superfícies inertes e em tecidos vivos e formadora de biofilmes densos (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999; PALLERONI, 2015). Nasirmoghadas e colaboradores (2018) apontam que 93% dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* formam biofilmes com 75% de resistência extensiva a antimicrobianos, exceto à Polimixina, uma droga com alto grau de toxicidade neurológica e renal.

Uso prévio e inadequado de antibiótico de amplo espectro, permanência hospitalar prolongada, internações em unidades de terapia intensiva (UTIs), uso de dispositivos médicos invasivos, comorbidades associadas e formação de biofilme são considerados fatores de risco independentes para aquisição de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos, assim como por altas taxas de mortalidade por complicações decorrentes do quadro infeccioso (HOANG et al, 2018; JEONG et al, 2014; LUCENA et al, 2014; PALAVUTITOTAL et al, 2018).

Apontada pela Organização mundial de Saúde (OMS) como patógeno de prioridade crítica que demanda pesquisas, desenvolvimento de tecnologias e medicamentos para enfrentamento da crescente resistência antimicrobiana, somado aos elevados custos de saúde e desfechos clínicos desfavoráveis, as infecções hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa* exigem a adoção de terapias

coadjuvantes que apresentem eficácia antimicrobiana com baixo custo, poucos efeitos colaterais e que não oportunizem o desenvolvimento de mecanismos de resistência (MORALES et al, 2012; MORATA et al, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 2017).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (termo originado do inglês, antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT) é considerada um promissor método de tratamento para a erradicação de microrganismos, sendo clinicamente aprovada para o tratamento de diversas moléstias infecciosas (DARLENSKI e FLUHR, 2013). Trata-se de uma técnica em que a luz é utilizada para ativar compostos químicos chamados fotossensibilizadores (FS) que ao interagirem com o oxigênio molecular produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais causam danos oxidativos diretos ao microrganismo e/ou desestabilizam a estrutura do biofilme, expondo as bactérias à ação de antibióticos e demais substâncias com atividade antimicrobiana (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016; VASSENA et al, 2014).

Atualmente, a curcumina, um derivado da *Curcuma longa*, conhecida popularmente por açafrão-da-Índia tem sido utilizada com sucesso como fotossensibilizador em aPDT. Composto polifenólico de pigmento amarelo-alaranjado que ao ser solubilizado é capaz de absorver luz azul na faixa espectral de 405 - 435 nm, cuja interação com a luz, ocorre em um curto intervalo de tempo, propiciando um rápido efeito fototóxico às biomoléculas de células-alvo (ANDRADE et al, 2013; LIU et al, 2015; MAHDI et al, 2015; PASCHOAL et al, 2013).

Objetivando não apenas avaliar a efetividade da aPDT e antibioticoterapia frente a *Pseudomonas aeruginosas*, trabalhos têm sido publicados ressaltando a ação dinâmica intracelular induzida por fotossensibilizantes e antibióticos, sua difusão dentro da célula e análise da ação de quórum sensing em biofilme (AMIN et al, 2012; BODELÓN et al, 2016; JUNG et al, 2014; PÄTZOLD, KEUNTJE e ANDERS-VON AHLFTEN, 2006). Neste sentido, importantes ferramentas como a microscopia confocal de varredura a LASER (CSLM) e a microespectroscopia Raman têm sido empregadas de forma complementar na execução destas análises. A CSLM é um método não-invasivo, com uso opcional de marcadores e sondas fluorescentes que, a partir da luz, consegue produzir imagens do espécime em seções ópticas

possibilitando o estudo de estruturas de biofilme sem danificar a amostra. Já a espectroscopia Raman é uma técnica em que fótons de luz interagem com uma amostra, produzindo um espectro Raman único para uma molécula como uma impressão digital, possibilitando estudar a estrutura e a dinâmica de células vivas únicas ou em biofilme, distribuição e mecanismos de ação de drogas e fotossensibilizadores sem a necessidade de coloração ou marcadores e sem perturbar o meio estudado (PADDOCK e ELICEIRI, 2014; SCALFI-HAPP et al, 2007).

Apesar de ser, até o presente momento, um estudo inédito, pesquisas promissoras na área da aPDT aliados aos avanços tecnológicos na área de microscopia possibilitaram a aquisição de conhecimentos para uma melhor compreensão dos efeitos e mecanismos moleculares da ação da curcumina frente a estrutura de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* ao se aplicar distintos protocolos delineados para esta pesquisa.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* E AS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

As infecções nosocomiais ou infecções relacionadas aos cuidados de saúde podem ser definidas como infecções contraídas em instalações de cuidados de saúde, ocorrendo mais de 48h após a admissão. Segundo estimativa global da OMS mais de 1,4 milhões de pacientes em países desenvolvidos e em desenvolvimento são acometidos por infecções nosocomiais. Apesar dos esforços em prevenir as infecções associadas aos cuidados de saúde com o envolvimento frequente de patógeno multirresistente a antibióticos, este continua sendo um grave problema de saúde pública (ESPÓSITO e DE SIMONE, 2017, WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2009).

Entre estes patógenos destaca-se *Pseudomonas aeruginosa* uma bactéria Gram-negativa, oportunista, frequentemente isoladas em pacientes com fibrose cística, bacteremia, infecções do trato urinário, otite externa, feridas crônicas, especialmente em grandes queimados internados em unidades de terapia intensiva (RUFFIN, BROCHIERO, 2019; SKARIYACHAN et al, 2018). Além disto, apresentam alta capacidade de formação de biofilmes densos, condição que a tornam mais resistente à ação de antimicrobianos e às reações imunes do hospedeiro (NASIRMOGHADAS et al, 2018; PALLERONI, 2015; WHO, 2017).

A abordagem terapêutica medicamentosa convencional contra infecções causadas por *P. aeruginosa* é realizada com o uso de antibióticos pertencentes a várias classes de fármacos: aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas antipseudomonias, fluorquinolonas, cefalosporina + inibidores de  $\beta$ -lactamase, penicilinas antipseudomonias + inibidores de  $\beta$ -lactamase, monobactamas, ácido fosfônico e polimixina (MAGIORAKOS et al, 2012; MENSA et al, 2018).

Com base nestas classes de antibióticos foram definidas categorias de resistência a antibióticos desenvolvidas por *Pseudomonas aeruginosa*:

*Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (MDR-PA) - são resistentes a pelo menos um agente pertencente a três ou mais classes de antimicrobiano;

*Pseudomonas aeruginosa* extensivamente resistentes (XDR-PA) - neste nível, as bactérias são resistentes a pelo menos um agente, em todas as classes antimicrobianas, exceto em duas ou menos;

*Pseudomonas aeruginosa* pan-resistentes (PDR-PA) - apresentam resistência a todos os agentes antimicrobianos listados (MAGIORAKOS et al, 2012).

Em relatório sobre Vigilância do Consumo de Antibióticos realizada em 65 países e territórios, a OMS aponta que a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos está relacionado ao seu uso excessivo e inadequado, reforçando a necessidade de implementação urgente de políticas de prescrição como forma de conter a antibioticoterapia indiscriminada. As infecções por *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos, principalmente a carbapenêmicos, estão associadas a custos diretos de saúde mais elevados, infecção de início mais rápido, uso de dispositivos médicos invasivos, prolongamento do tempo de internação, assim como uma progressão mais acelerada até a morte, sendo responsáveis por taxas de mortalidade entre 60-100% mesmo diante dos avanços dos antimicrobianos (BOU et al 2009, JEONG et al, 2014, LUCENA et al, 2014).

Como já destacado pela OMS, *Pseudomonas aeruginosa* tornou-se um patógeno emergente, de prioridade crítica que demanda não somente o desenvolvimento de novos antibióticos, mas também a necessidade de pesquisas e implementação de ações de prevenção e controle de sua disseminação, principalmente em ambientes relacionados aos cuidados de saúde (WHO, 2017 e 2018).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE *P. aeruginosa*

Em 1882, Carle Gessard intrigado com a coloração verde azulada dos curativos, pesquisou e isolou pela primeira vez, uma bactéria aeróbica, móvel, de fácil crescimento em fluidos corporais e produtora de pigmento azul já nomeado anteriormente de piocianina. Doze anos após, Walter Migula descreveu estas mesmas bactérias, agrupando-as em um gênero que nomeou de *Pseudomonas*, palavra de origem grega que significa Pseudo (= falsa) e monas (= unidades), uma possível menção ao protista nanoflagelado, *Mona* (GESSARD, 1882; HUGH e LESSEL, 1967; PALLERONI, 2010).

Atualmente, *Pseudomonas aeruginosa* é classificada filogeneticamente como pertencente à classe das gamma-proteobacteriae e família das pseudomonaceae, caracterizando-se por um bastonete Gram-negativo, de forma reta ou levemente curvada, medindo de 1- 3 mm de comprimento que pode ser encontrada isoladamente ou em pares. São móveis por meio de um único flagelo polar, composto por flagelina e apresentam pilis do tipo IV, ambas as estruturas desempenhando um papel importante na motilidade, como fator de virulência e no processo de fixação às superfícies (Figura 1). A depender do fenótipo podem apresentar diferentes

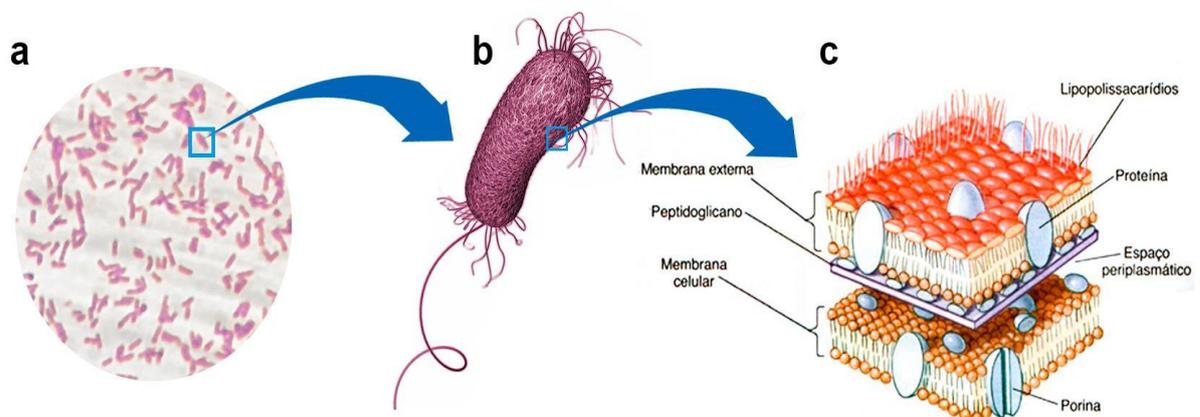


Figura 1- *Pseudomonas aeruginosa*.

1a- Em coloração de Gram; 1b- microorganismo isolado e 1c- membrana celular

Fontes: a- autora, b- Adaptado de: CDC, 2017 e c- Adaptado de BLACK, 2016.

morfologias, até mesmo em um único isolado, podendo ser colônias grandes, lisas, iridescentes, planas com centro elevado e bordas irregulares ou colônias pequenas, puntiformes, ásperas e convexas ou ainda, colônias grandes e mucoides comumente observada em isolado respiratório de pacientes com fibrose cística. Produzem pigmento como a pioverdina e piocianina e algumas cepas podem produzir piorrubina, pigmento de cor avermelhada ou piomelanina, um pigmento de cor marrom. Pode ser encontrada no solo, água, plantas, animais, ambientes e líquidos contaminados, na forma planctônica ou em biofilme. Crescem preferencialmente em ambientes úmidos, a uma temperatura ideal de 37 °C, tendo a capacidade de apresentar crescimento a temperaturas de até 42 °C, assim como em altas concentrações de sais, corantes, antissépticos e antibióticos. De respiração tipicamente aeróbica, alguns estudos mostram sua capacidade de sobrevivência em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, utilizando o nitrato como acceptor final de elétrons (LINCOPAN e TRABULSI, 2008; PALLERONI, 2015).

São bactérias não-fermentadoras de carboidratos, apresentam grande versatilidade metabólica sendo capaz de crescer em meios escassos de nutrientes, tendo sido relatado seu crescimento até em água destilada. Possivelmente, por possuir um genoma complexo e relativamente grande de 6 - 7 milhões de pares de bases (Mb), apresenta expressiva capacidade de detectar sinais ambientais, adaptando-se às condições flutuantes do meio, de expressar fatores de virulência, de formar biofilme e mecanismos de resistência a antibióticos e desinfetantes, condições estas que a tornam, entre outros aspectos, um patógeno nosocomial de relevância clínica (FAURE, KWONG E NGUYEN, 2018; FRESCHI et. al, 2019; PALLERONI, 2015; STOVER et. al, 2000).

### 2.3- FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogênese da *P. aeruginosa* é considerada multifatorial visto que no processo de invasão e colonização participam diversos fatores como os associados à célula (flagelos, pillis) e mecanismos ativos (alginato, quórum sensing- QS e fatores

secretados). Estes fatores de virulência se expressam em quantidade e em forma diferenciada dependente do tipo de infecção já que o sistema imune inato é capaz de detectá-los e obrigar a bactéria a acionar seus mecanismos de modulação do potencial de virulência, burlando o sistema de defesa do hospedeiro. Neste sentido, observa-se em infecções agudas, por exemplo, a expressão de muito destes fatores o que não ocorre em infecções crônicas que são comumente desprovidas de flagelos e pilis, ao passo que se destacam na produção de biofilme, superexpressão de alginato e de genes ligados ao quórum sensing (BALLOY et al, 2007; GARCIA et al, 2018; WOLFGANG et al, 2004).

### **2.3.1 Fatores de virulência associados à bactéria**

Flagelo e pili do tipo IV - compostos respectivamente pelas proteínas flagelina e pilina, participam de forma cooperativa nos processos de motilidade, aderência e colonização bacteriana em tecido hospedeiro, contribuindo ativamente na produção de biofilme (CONRAD et al, 2012). No entanto, a persistência destas estruturas tão essenciais aos processos iniciais de instalação da infecção determinaria a ativação do sistema imune mediado por flagelina. Neste contexto, *Pseudomonas aeruginosa* parece obstar esta ativação ao lançar mão de mecanismos como a perda de flagelo, utilizando para este fim, outros fatores de virulência secretados como a produção de proteases. Com o fenótipo de motilidade reprimido, a bactéria se torna aproximadamente 100 vezes mais resistentes à fagocitose, além de reduzir a resposta inflamatória com diminuição de citocinas (CASILAG et al, 2016; HONG e GHEBREHIWET, 1992).

### 2.3.2 Fatores de virulência secretados

*Pseudomonas aeruginosa* secretam os seguintes fatores de virulência:

a) Sistema de secreção de moléculas - sistema cujas substâncias secretadas no meio permitem a instalação do processo infeccioso através da ruptura da integridade de tecidos e interferência no sistema imunológico. A síntese destas substâncias ocorre por meio de três distintos sistemas denominados de sistema de secreção de moléculas do tipo I (T1SS), sistema de secreção de moléculas do tipo II (T2SS) e sistema de secreção de moléculas III (T3SS) (GEORGESCU et al, 2016; JAFFAR-BAUDJEE et al, 1995; RANGEL et al, 2015).

- T1SS: secreta protease alcalina capaz de degradar flagelina impedindo seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, além de impedir a formação de fibrina, ambas as funções exercidas por ação sinérgica com outras proteases (HONG e GHEBREHIWET, 1992).

- T2SS: produz proteínas com efeitos citotóxicos e mediadores de inflamação como as fosfolipases C, exotoxina A e elastases.

Fosfolipases C - frequentemente encontradas em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* podem ser do tipo fosfolipase C hemolítica e fosfolipase C não-hemolítica que atuam sinergicamente na ação de degradação da membrana celular do hospedeiro através da hidrólise de fosfatidilcolina, esfingomiélin e fosfatidilserina (GEORGESCU et al, 2016).

Exotoxina A - toxina secretada na fase estacionária do crescimento bacteriano associada à resistência a antibióticos. É capaz de bloquear a síntese de proteínas juncionais, permitindo a passagem de toxinas e bactérias através das células com consequente destruição do tecido do hospedeiro e aumento da oferta de ferro e nutrientes aos microrganismos (AMIRMOZAFARI, FALLAH E HABIBI, 2016; AZGHANI et al, 1996).

Elastases - também conhecidas como pseudolisinas, são metaloproteases que desestruturam tecidos e inativam componentes do sistema imune tais como: mediadores inflamatórios (AZGHANI et al, 2014; SAINT-CRIQ et al, 2017 ), fatores de complemento (HONG e GHEBREHIWET, 1992), proteína surfactante A (KUANG et al, 2011), bem como colágeno (NAGANO et al, 2001), fibrina (REIHILL et al, 2017), elastina (YANG et al, 2015) e alginato (KAMATH, KAPATRAL e CHAKRABARTY, 1998). Além disso, semelhantemente às proteases alcalinas, as elastases apresentam atividade antiflagelina em meios repletos do íon cálcio, impedindo a ativação do sistema imune. (CASILAG et al, 2016).

- T3SS: este sistema secreta exoenzimas que são introduzidas diretamente no citoplasma da célula do hospedeiro. Quatro genes expressam essas exoenzimas: EXO-U, EXO-Y, EXO-T e EXO-S.

EXO-U - expressa a exoenzima U, indutora de apoptose, necrose e amplificadora de resposta inflamatória. Pode estar associada a maior resistência a antibióticos, especialmente aos  $\beta$ -lactâmicos (SAWA et al, 2014; ZHAO, ZHENG e CHEN, 2012).

EXO-Y - expressa a exoenzima Y, uma adenilato-ciclase que altera os níveis de adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico (c-AMP) e a morfologia da célula eucariota através da ruptura de citoesqueleto de actina e das barreiras em células endoteliais e pulmonares, resultando em bacteremia (COWEL, EVANS e FLEISZIG, 2005; YAHR et al, 1998).

EXO-T e EXO-S - expressam a síntese de exoenzimas T e S, respectivamente. Ambas inibem a síntese nuclear de DNA, desestruturam o citoesqueleto com destruição de sua função de barreira, além de retardar o processo de reparo tecidual de feridas, propiciando a disseminação bacteriana (HUBER et al, 2014; RANGEL et al, 2015).

- b) Piocianina - pigmento azul produzido por algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cujos efeitos citotóxicos sobre células epiteliais, endoteliais e células de defesa favorecem significativamente a colonização e

sobrevivência de bactérias em tecido hospedeiro (LAU et al, 2004; LI et al, 2019).

- c) Hemolisinas - são toxinas extracelulares capazes de causar lise a glóbulos vermelhos com consequente liberação de ferro no meio, o que funciona como fator de crescimento para o microrganismo, propiciando a extensão e disseminação da infecção (GEORGESCU et al, 2016).
- d) Alginato - polissacarídeo componente da matriz extracelular capaz de produzir biofilmes espessos e bem estruturados, o que o torna um potente fator de virulência capaz de conferir ao microrganismo, resistência antimicrobiana e proteção contra o sistema imune do hospedeiro (LEID et al, 2005; POURNAJAF et al, 2018).
- e) Quórum sensing - mecanismo de comunicação entre as células do biofilme e destas com meio, baseado na detecção da densidade populacional da microcolônia, permitindo que as bactérias atuem de forma coordenada na regulação de vários dos fatores de virulência acima citados (ALAYANDE, AUNG e KIM, 2018; SCHUSTER et al, 2003). Com um arsenal de mais de 300 genes regulados por QS, consegue ativar, reprimir e desreprimir a expressão de genes, de forma cautelosa, sem que haja sobrecarga de produção à população da microcolônia (SCHUSTER et al, 2003). Quórum sensing regula a produção de proteínas secretadas como elastases, proteases alcalinas, exotoxina e piocianina (LE BERRE et al, 2008; CASILAG et al, 2016). Outra importante atuação de QS é sobre a formação de biofilme, uma estrutura importante para a sobrevivência das bactérias diante das ameaças do meio e do sistema imune do hospedeiro que será discutida a seguir (ALAYANDE, AUNG e KIM, 2018).

## 2.4 BIOFILMES BACTERIANOS

De grande versatilidade metabólica, *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de sofrer alterações fenotípicas para alterar sua forma de vida planctônica, livre e móvel em suspensão líquida para uma forma de vida sésil e em comunidade conhecida como biofilme. Considerado como uma estrutura complexa, o biofilme é composto por um consórcio de microrganismos que crescem aderidos a um substrato envolto por uma matriz autosssecretada que possibilita ao microrganismo sobreviver às condições adversas do meio. (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999; LEID, 2009; SAUER et al, 2002).

Baixas concentrações de oxigênio e escassez de nutrientes no interior dos biofilmes reduzem a atividade metabólica das células bacterianas, conduzindo-as ao crescimento estacionário, condição que restringe a ação de antibióticos. Além disso, penetração limitada de certos antimicrobianos, ação de componentes da matriz extracelular e presença de enzimas como  $\beta$ -lactamases também são apontados como fatores que contribuem para a resiliência dos biofilmes frente a estes fármacos (CHIANG et al, 2013; WALTERS et al, 2003).

Em geral, a matriz extracelular do biofilme é composta por polissacarídeos, proteínas, e ácido nucleicos.

- a) Polissacarídeos - produzidos por um complexo de proteínas transmembranas, PSL (originado do termo, locus de síntese de polissacarídeo), PEL (termo originado de película) e alginato podem participar da formação da matriz de biofilme. PSL e PEL são polissacarídeos com a função de manter a estabilidade da matriz e aumentar a superfície de contato célula-célula, facilitando a intercomunicação dentro do biofilme (HEIDARY et al, 2016). Diferentemente destes, o alginato é produzido por cepas de fenótipo mucoide encontradas em processo de infecção persistente como as infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística, sendo formador de biofilmes espessos e bem estruturados (CIOFU et al, 2008; LEID et al, 2005).

- b) Proteínas - majoritariamente constituídas por proteínas de vesículas da membrana externa contribuem para a formação estrutural e estabilidade do biofilme. No entanto, também são capazes de alterar a estrutura ou dispersar o biofilme por meio de propriedades enzimáticas que possibilitam a hidrólise de componentes da matriz como as próprias proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular (e-DNA) (KARATAN e WATNICK, 2009; NIJLAND, HALL e BURGESS, 2010; TOYOFUKU et al, 2016).
- c) Ácidos nucleicos - representados pelo e-DNA cuja formação ocorre a partir de vesículas de membrana. A lise controlada de células também contribui para a formação deste componente da matriz que desempenha importantes funções na estruturação e estabilidade do biofilme. Estudos mostram que, por ser uma fonte de carbono, nitrogênio e fosfato, o e-DNA pode ser utilizado como fonte de nutriente dentro do biofilme. Acrescenta-se a esta função, sua participação na coordenação do tráfego celular em ambiente de microcolônia e acidificação do meio favorecendo o desenvolvimento de fenótipo resistente a antibiótico (GLOAG et al, 2013; MULCAHY, CHARRON-MAZENOD e LEWENZA, 2010; TURNBULL et al, 2016).

A formação do biofilme ocorre por meio de uma sequência de distintos eventos, iniciada pela fixação da bactéria à superfície, seguida da etapa de maturação do biofilme e finalizada pela dispersão ativa para formação de um novo biofilme (Figura 2).



Figura 2- Estágios de formação do biofilme.

Fonte: Adaptado de Macêdo e Abraham, 2009.

O processo de adesão à superfície se inicia tão logo ocorre a perda do flagelo, marcando a passagem da forma planctônica para o modo de crescimento em biofilme. Esta fixação ocorre pelo polo da célula, de forma reversível e ao receber contribuições do pili do tipo IV, proteínas chamadas adesinas e segundos mensageiros como (3'-5') guanosina monofosfato cíclica dimérica (c-di-GMP), as bactérias se ligam irreversivelmente ao substrato (HOSPENTHAL, COSTA e WAKSMAN, 2017; O'TOOLE e KOLTER, 1998).

No processo de maturação do biofilme, as bactérias fixadas à superfície iniciam o processo de divisão celular e passam a secretar a matriz polimérica extracelular que utiliza compostos metabólicos, como a lactona N-acil homoserina (AHLs), para organizar a formação das microcolônias. Estes compostos metabólicos funcionam como moléculas sinalizadoras do quórum sensing que desempenham papel importante na regulação da densidade populacional e motilidade bacteriana, expressão de genes relacionados a produção de fatores de virulência, no metabolismo respiratório (desnitrificação) e proteção do biofilme contra o sistema imune do hospedeiro e ação dos antibióticos (ANTUNES et al, 2010; LEID et al, 2009; McCREADY et al, 2019; PASSADOR et al, 1999; SARKISOVA et al, 2014; WHITELEY, DIGGLE e GREENBERG, 2017).

Por último, ocorre a dispersão ativa, um mecanismo de escape desenvolvido por bactérias em biofilme acionado por sinais de dispersão como o aumento de ácidos graxos, da densidade populacional e de agentes agressores (produtos químicos, antibióticos), além de alterações de constituintes do meio (aumento de carbono, escassez de nutrientes, mudanças de temperatura, acúmulo de metabólitos) e enzimas como a alginatoliase e DNase, fazendo com que estas células enclausuradas na matriz de exopolissacarídeos (EPS) se desprendam e migrem para um ambiente mais favorável à formação de um novo biofilme (DAVIES e MARQUES, 2009; KAPLAN, 2010; SAUER et al, 2002; TOYOFOKU et al, 2016).

## 2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

Escrituras datadas de mais de 4000 anos atrás, contidas no livro sagrado dos Indianos, Atharva Veda, já relatavam a ingestão de substâncias naturais derivadas de sementes e raízes como a *Cúrcuma longa* que aliada à exposição solar eram a base de tratamento de doenças como vitiligo (FITZPATRICK e PATHAK, 1958). Em 1893, Finsen relata o uso de luz vermelha no tratamento de varíola, cessando o processo de supuração das lesões e, em 1901, publica um livro intitulado “Phototherapy” destacando o tratamento de lúpus vulgaris baseado no uso da radiação ultravioleta, recebendo por este trabalho, o prêmio Nobel (DANIELL e HILL, 1991).

Um marco importante ocorre ainda no final do século XIX quando o estudante Oscar Raab, durante seus estudos sobre a toxicidade da acridina em relação ao *Paramecium caudatum*, percebeu que ao ser exposta à luz, a acridina era capaz de inativar todos estes protozoários em um tempo significativamente menor quando comparada às amostras que permaneciam no escuro. Raab ainda demonstrou que o efeito letal observado sobre a cultura de protozoário não se devia ao uso isolada da luz, mas que esta era capaz de transferir energia ao fotossensibilizador (acridina), como em reações de fotossíntese em que a luz é absorvida por clorofila (RAAB, 1900). Posteriormente, com base nestas observações, Von Tappeiner e Jodlbauer (1907),

designam o termo 'reação fotodinâmica' para se referir ao fenômeno descrito inicialmente por Raab.

Com as pesquisas estagnadas devido às duas grandes guerras mundiais e o advento da descoberta da penicilina, Thomas Dougherty, na década de 1970 reacende o interesse pela TFD ao realizar pesquisa com hematoporfirinas e uma fonte de luz vermelha, registrando o primeiro relato de cura completa de tumores mamário em camundongos, o que possibilitou sua primeira aprovação pelo Food and Drugs Administration (FDA), em 1993, para uso clínico em tratamento profilático de câncer de bexiga. Várias pesquisas passaram a comprovar a eficácia da PDT alcançando o status de modalidade de tratamento reconhecidamente eficaz nos casos de câncer como carcinoma basocelular, câncer de esôfago, de estômago, de pulmão e displasia cervical (DOUGHERTY et al, 1998).

Avanços na área de pesquisa sobre fotossensibilizadores, criação de fontes de luz como LASER e LED e uma crescente resistência a antimicrobianos impulsionaram os estudos com aPDT no início dos anos 1990, revelando-a como uma terapia de grande potencial ainda a ser explorado. (ABRAHAMSE E HAMBLIN, 2016; HAMBLIN, 2016; WAINWRIGHT, 1998).

### **2.5.1 Mecanismos de ação da aPDT**

A aPDT está baseada no tripé fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular. Fotossensibilizadores são substâncias que em seu estado fundamental são capazes de absorver fótons de luz de comprimento de onda adequado, coincidente com a faixa de absorção do FS, de modo que seus elétrons sofram transição eletrônica e passem ao estado excitado singlete. Como este estado é fugaz, o FS excitado pode perder energia na forma de calor ou fluorescência, retornando ao estado fundamental, não excitado. Outra possibilidade se faz por meio de processos como o cruzamento inter-sistemas que permite ao fotossensibilizador excitado sofrer transição para o estado tripleto, de meia-vida mais longa. Para retornar ao estado fundamental, o FS no estado

excitado tripleto pode emitir fosforescência ou transferir, direta ou indiretamente, energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio.

Neste ponto, as reações fotoquímicas podem seguir por distintas vias de reações do tipo I e reações do tipo II. Nas reações do tipo I, o FS excitado tripleto transfere átomos de hidrogênio ou elétrons para substratos orgânicos, aceptores de elétrons que passam a produzir radicais livres que ao reagir com o oxigênio gera espécies reativas de oxigênio como radical superóxido ( $O_2^-$ ) que podem sofrer dismutação originando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ). Já nas reações do tipo II, o FS excitado em estado tripleto transfere energia direta ao oxigênio molecular, levando à produção de uma espécie reativa de oxigênio, o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), como mostrado na figura 3, em uma proporção de até 1:10000, ou seja, cada molécula de FS em estado tripleto pode produzir até dez milhares de moléculas de oxigênio singleto, um potente efeito fotocatalítico (ABRAHAMSE E HAMBLIN, 2016; ATHAR, MUKHTAR e BICKERS, 1998; HUANG et al, 2012; WAINWRIGTH, 1998; WAINWRIGTH et al, 2016).

A ocorrência de reação do tipo I ou tipo II depende do tipo, concentração e hidrofobicidade do FS, bem como da competição de substratos e oxigênio molecular por suas moléculas. Independentemente da ERO gerada, esta é capaz de oxidar simultaneamente biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos celulares que conduzem à morte, sem oportunizar o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Além da ação antimicrobiana que também é observada em cepas multirresistentes, a aPDT é capaz de agir sobre a matriz de biofilme e em seus componentes responsáveis por sua estabilidade estrutural, causando sua disruptura. (ATHAR, MUKHTAR e BICKERS, 1998; BAPTISTA et al, 2017; HAMBLIN e ABRAHAMSE, 2018; VASSENA et al, 2014).

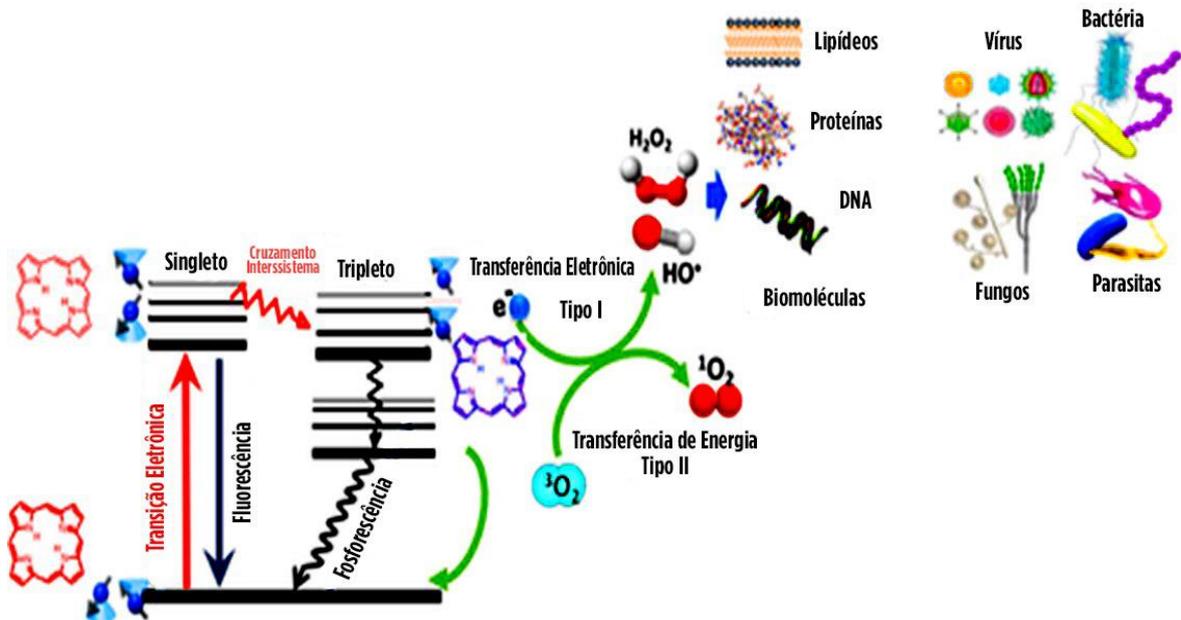


Figura 3- Diagrama de Jablonski.

O FS em seu estado fundamental, ao absorver a luz, seus elétrons sofrem transição eletrônica para um nível de maior energia, passando para o estado excitado singlete. Neste estado, O FS excitado pode perder energia na forma de fluorescência ou calor, retornando ao estado fundamental ou por meio de cruzamento inter-sistemas sofrer transição para o estado excitado triplete, de meia-vida mais longa. Para retornar ao estado fundamental, FS no estado triplete pode emitir fosforescência ou transferir, direta ou indiretamente, energia para o oxigênio molecular, gerando EROs, como radicais superóxido e hidroxila (nas reações de tipo I), e oxigênio singlete (em reações de tipo II). Estes ROS podem danificar a maioria dos tipos de biomoléculas presentes em células e microrganismos.

Fonte: Adaptado Hamblin e Abrahamse, 2018.

### 2.5.2 Fotossensibilizadores

São moléculas capazes de absorver luz em uma determinada faixa espectral, desencadeando a produção de substâncias citotóxicas, cuja reação fotoquímica é denominada de efeito fotodinâmico. Para desempenhar sua função com eficiência e segurança, um bom fotossensibilizador deve apresentar algumas propriedades, tais como: Baixos níveis de toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, facilidade na formulação, boa solubilidade, vida útil estável, ser ativado por baixas fluências de luz, apresentar seletividade para células microbianas, ótimo rendimento

quântico de oxigênio singlete, não servir como substratos de bombas de efluxo de bactérias e não sofrer fotodegradação. (ABRAHAMSE E HAMBLIN, 2016; CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; REGO FILHO, 2014; SHARMA, CHIANG e HAMBLIN, 2011; WAINWRIGTH, 2016).

É fato que bactérias Gram-negativas são mais resistentes à inativação fotodinâmica, sendo sua estrutura de membrana diferenciada apontada como a principal causa da menor responsividade ao processo fotoquímico. Diferentemente de bactérias Gram-positivas, as Gram-negativas apresentam membrana externa composta por uma bicamada constituída por fosfolipídios e lipopolissacarídeos, carregada negativamente, o que a torna pouco permeável a moléculas pequenas, dificultando a difusão do fotossensibilizador (HUANG et al, 2012; SPERANDIO, HUANG, HAMBLIN, 2013).

Uma gama de FS são utilizados com a finalidade de fotoinativação microbiana, tais como:

- a) Porfirina - os derivados da hematoporfirina pertencem à primeira geração de FS que foi desenvolvida para uso em PDTs oncológicas, passando também a ser utilizada na terapia fotodinâmica antimicrobiana. Absorvem luz no comprimento de onda de 610 - 630 nm e tendem a interagir causando danos peroxidativos às membranas. Apresentam algumas desvantagens de uso como baixa estabilidade química, fototoxicidade da pele prolongada e baixa seletividade de captação por células alvo em relação às células do hospedeiro (ATHAR, MUKTAR e BICKERS, 1998; OCHSNER, 1997; ROSA e SILVA, 2014).
- b) Ftalocianina - com estrutura semelhante à porfirina, porém pertencentes à segunda geração de FS, as ftalocianinas são moléculas hidrofóbicas neutras que absorvem luz na faixa espectral infravermelha e apresentam alto rendimento quântico de oxigênio singlete quando são adicionado metais como alumínio e zinco à sua estrutura (BAGNATO, 2008; RIBEIRO et al, 2015).
- c) Clorina - também é um FS de segunda geração, uma forma reduzida da porfirina, aniônica, uso eficaz, com grande rendimento quântico de oxigênio

singleto, sendo a fotossensibilidade de pele seu único inconveniente (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

- d) Ácido 5 - aminolevulínico (5 - ALA) - molécula hidrofílica, não possui propriedade fotoativa, de modo que sua aplicação na PDT está baseada em sua capacidade de, ao ser administrada exogenamente, se acumular endogenamente em forma de porfirinas fotoativas (FOTINOS et al, 2008).
- e) Xantenos - absorvem luz no espectro 480 - 550 nm, são moléculas aniônicas que se ligam à membrana celular e ficam no citoplasma. Pertencem a este grupo: Rosa Bengala, eosina Y, fluoresceína e eritrosina (GOULART et al, 2010).
- f) Fenotiazinas - representados pelos azul de metileno e azul de orto-toluidina, são FS catiônicos que absorvem luz no espectro vermelho (630 – 680 nm), apresentando boa penetração em tecidos. Além disso, possuem bom rendimento quântico de oxigênio singleto e são capazes de provocar fotodano na membrana de células-alvo. Como desvantagem, até o presente momento, são os únicos FS que funcionam como substratos para bomba de efluxo de bactérias podendo ser expulsos. (GOLLMER et al. 2017; ROSA et al, 2014).
- g) Fuleranos - são moléculas compostas por 60 átomos de carbono, formando uma estrutura de gaiola. Altamente hidrofóbica, necessitam de alterações químicas e estruturais para aumentar sua solubilidade em meios biológicos, bem como melhorar o rendimento quântico de oxigênio singleto para apresentar efetividade na inativação microbiana. Tem como vantagens menor fotodegradação e ação fotodinâmica por meio dos dois tipos de reação (tipo I e II) (SHARMA, CHIANG e HAMBLIN, 2011).

Atualmente, muitos dos FS utilizados tem sofrido alterações em sua estrutura química ou sido conjugados a outras moléculas catiônicas ou a moléculas que facilitem seu transporte ou que aumente a permeabilidade através das membranas das bactérias, sendo denominados de terceira geração de fotossensibilizadores (HUANG et al, 2017; SPERANDIO, HUANG, HAMBLIN, 2013).

Apesar das rotas de síntese de drogas fotoativas quimicamente alteradas com o propósito de potencializar o dano fotoinduzido, o uso de fotossensibilizadores naturais como clorofila, riboflavina, psoralenos, hipericina e principalmente a curcumina vêm sendo evidenciada como uma nova perspectiva na terapia fotodinâmica antimicrobiana com produção de resultados igualmente significativos (ARAÚJO et al, 2018; SPERANDIO, HUANG, HAMBLIN, 2013; YIN e HAMBLIN, 2015).

#### 2.5.2.1 Curcumina como fotossensibilizador

A curcumina é um componente ativo da *Curcuma longa*, um rizoma pertencente à família das Zingiberaceae, popularmente conhecido como cúrcuma, gengibre amarelo, açafão-da-terra ou açafão-da-Índia. Registros do uso do açafão datam de quase 4000 anos atrás, tendo sido utilizado pelas civilizações antigas, tanto como corante, tempero e agente terapêutico. A aplicação terapêutica deste rizoma, trilhou caminho dentro da medicina Ayurvédica e ainda nos dias atuais continua a ser a erva mais popular e mais pesquisada da Índia, interesse este não restrito somente ao continente asiático (D'SOUZA et al, 2017; KOROSSY E BLÁZOVICS, 2016). Prova disto é o crescimento expressivo de mais de 200% nas publicações sobre o assunto, quando se compara o montante de artigos elencados na base de dados do Pubmed entre janeiro de 2014 (6.000) e janeiro de 2019 (mais 12.000), demonstrando a dimensão da expectativa e importância que assumiu na medicina mundial (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2018).

Embora suas aplicações sejam milenares, estudos mais consistentes sobre a química da curcumina são registrados a partir do início do século XIX, mais precisamente em 1815, quando Vogell e Pelletier descreveram que, após processo de extração, verificou-se que a cor amarela da cúrcuma era derivada de suas resinas e óleo. Com aprimoramento deste método, 1842, Vogell Jr. consegue isolar uma substância mais pura obtida em grande parte da resina, porém não apresenta sua fórmula molecular. Ao longo dos anos vários pesquisadores, utilizando de técnicas e métodos diversos tentaram a extração pura da curcumina, bem como definir sua

fórmula química. Estas indefinições constituíram entraves aos avanços das pesquisas sobre a curcumina, sendo sua fórmula molecular correta -  $C_{21}H_{20}O_6$  - definida um século após o primeiro relatório sobre esta substância. Em 1953, Srinivasan, através da análise por cromatografia estabeleceu que além da curcumina, a cúrcuma é composta por outros dois componentes amarelos denominados curcuminoides: demethoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina (COOKSEY, 2017; JACKSON e MENKE, 1881; KOCAADAM E ŞANLIER, 2015).

O nome químico da curcumina é 1,7- bis - (4-hidroxi-3-metoxifenil) - hepta1,6-dieno-3,5-diona, fórmula química é  $C_{21}H_{20}O_6$  e o valor de pKa de 8,54. A curcumina exibe tautomerismo possuindo uma porção ceto-enol ou di-ceto e por esta condição pode se apresentar como espécie aniônica ou neutra (Figura 4).

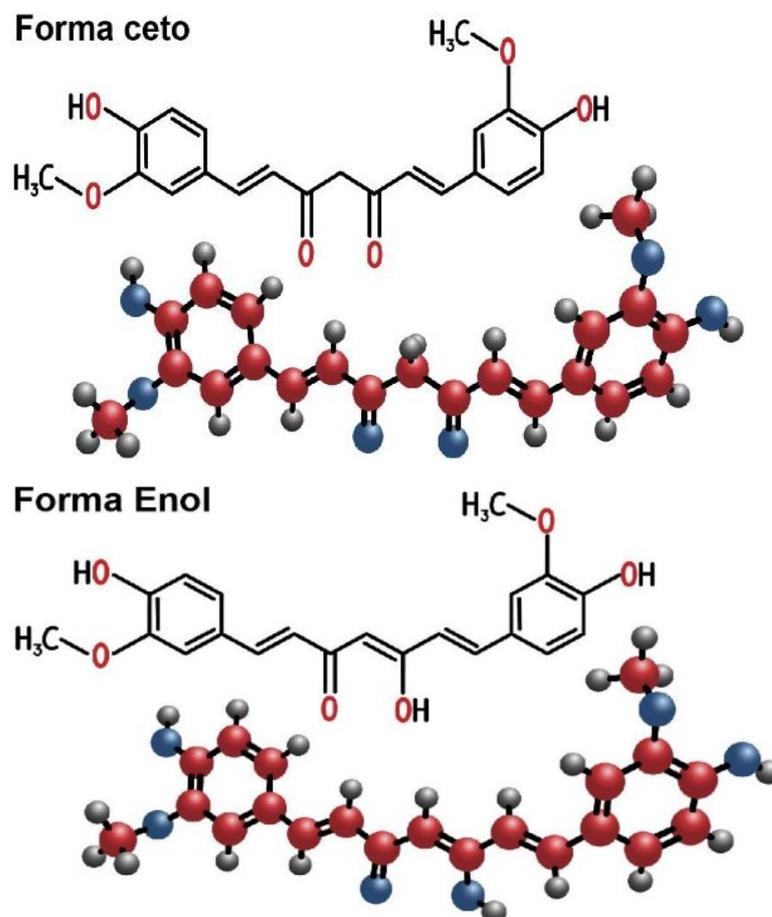


Figura 4- Tautomerismo da curcumina em condições fisiológicas.

Fonte: Adaptado de banco de imagens iStock, 2019.

Em condições neutras, a forma ceto é predominante, com capacidade de absorção de 353 nm e funciona como um potente doador de hidrogênio. No entanto, sob condições alcalinas, a forma enólica predomina, pois é fracamente ácida, com capacidade de absorção de 430 nm e sua degradação é rápida. É uma molécula lipofílica, fotossensível, com baixa solubilidade em água e altíssima solubilidade em solventes orgânicos próticos como metanol e etanol e apróticos polares como dimetilsulfóxido e acetona (COOKSEY, 2017; STRIMPAKOS e SHARMA, 2008). Além destes solventes, Carvalho et al (2015) observaram que o uso de surfactante não-iônico denominado monoleato de sorbitano etoxilado 80 (Tween 80) também foi capaz de aumentar a solubilidade da curcumina em 216 vezes quando comparada a solubilidade da curcumina pura.

A curcumina vem sendo empregada há muitos anos como agente terapêutico graças a seus efeitos biológicos como ação anticancerígena, hipoglicemiante, antiinflamatório, antibacteriano dentre outros. No entanto, o primeiro relato científico sobre as atividades biológicas antibacteriana da curcumina foi publicado somente em 1949, na revista Nature. Na ocasião, os pesquisadores observaram que a curcumina apresentou efeito antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Trichophyton gypseum* e *Mycobacterium tuberculosis* (GUPTA et al, 2012).

Além destes efeitos terapêuticos, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que, ao ser ativada por luz, a curcumina apresenta alta atividade antibacteriana contra diversos microrganismos, inclusive cepas multirresistentes ou englobadas em biofilme (ALMEIDA, PEREIRA e RODRIGUES, 2017; ARAÚJO et al, 2018; DAHL, BELSKI e REZKA, 1994; HU et al, 2018; NAJAFI, KHYAMZADEH e PAKNEJAD, 2016; ROSA et al, 2017).

Dovigo e colaboradores (2011) ao avaliarem diferentes protocolos com variações de concentração de curcumina e fluência de exposição ao LED, observaram efeitos antifúngicos significativos em culturas planctônicas e biofilmes de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Em um estudo para avaliar os efeitos de diferentes tempos de pré-irradiação e concentrações de curcumina contra culturas planctônicas e biofilmes de espécies de cândidas, foi verificado que o tempo de pré-irradiação não foi fator decisivo para a inativação total das espécies de fungos pesquisadas. No entanto, em biofilme, uma redução estatisticamente positiva na

viabilidade das espécies de cândidas só pode ser observada na aPDT com a maior concentração de curcumina (20  $\mu\text{M}$ ) e maior tempo de pré-irradiação (20min) definidos para o estudo (ANDRADE et al, 2013).

Pinto e colaboradores (2016), avaliaram, *in vitro*, a atividade fotodinâmica da curcumina nas formas promastigotas de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*, verificando sua capacidade de alterar a morfologia e, portanto, a viabilidade desta forma de protozoários. Além disto, apontaram como vantagem do tratamento com curcumina, a ausência de toxicidade no escuro.

Em relação às bactérias, Hu e colaboradores (2018) avaliaram a efetividade da aPDT com curcumina associada a EDTA e irradiada com luz azul, demonstrando sua capacidade de redução de 4  $\log_{10}$  na viabilidade de *Burkholderia cepacia*, possivelmente devido a danos ao DNA e proteínas dos microrganismos. Wu e colaboradores (2016) pesquisaram o efeito da inativação fotodinâmica mediada pela curcumina ativada por LED sobre *Vibrio parahaemolyticus*. Os autores verificaram uma redução significativa da viabilidade da bactéria acima de 6,5  $\log_{10}$  de redução e por meio de eletroforese, constataram que a PDT causou danos em proteínas de membrana e material genético da bactéria. A eficácia antimicrobiana de curcumina irradiada por LED azul frente a biofilme de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) também foi verificada na pesquisa de Araújo e colaboradores (2018), que registraram resultados estatisticamente significativos com redução de 3,66  $\log_{10}$  de MRSA quando comparado ao grupo controle.

A atividade antibacteriana da PDT mediada por curcumina também demonstrou ser capaz de prevenir o crescimento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uma bactéria Gram-negativa relacionada à indução e progressão de lesões periodontais (NAJAFI, KHYAMZADEH e PAKNEJAD, 2016). Ainda em relação a patógeno relacionados a doenças periodontais, Mahdi et al (2015) demonstraram que a curcumina ativada por luz azul apresentou elevada atividade bactericida contra *Fusobacterium nucleatum* quando comparada a outros fotossensibilizadores, além de conseguir erradicar *Porphyromonas gingivalis*, mostrando-se uma alternativa viável para o tratamento minimamente invasivo de patologias periodontais causadas por estas bactérias Gram-negativas.

## 2.6 FONTES DE LUZ

A luz e seus parâmetros como aplicação de um comprimento de onda adequado à faixa de absorção espectral do FS, dosimetria correta (potência de saída e densidade de energia) e o tempo suficiente de exposição à luz contribuem significativamente com os resultados da terapia fotodinâmica. Na inativação de bactérias por meio da PDT, fontes de luz coerente e não-coerente são utilizadas com sucesso tendo cada uma, vantagens e desvantagens peculiares, cujo custo-benefício precisa ser avaliado diante de situações específicas de uso (NAGATA ET AL, 2012, BAROLET, 2008).

A primeira fonte de luz utilizada para ativar substâncias fotossensibilizadoras, como psoralenos, utilizadas em tratamentos precursores à denominada terapia fotodinâmica foi a luz solar. Embasado cientificamente, a terapia fotodinâmica passou a ser realizada com o uso de luzes policromáticas e/ou não-coerentes com baixa penetração óptica (DANIELL e HILL, 1991; GØTZSCHE, 2011).

Somente a partir de 1960, com a criação do LASER (acrônimo do inglês, Light Amplification Stimulated Emission of Radiation), por Theodore Maiman, a PDT pode contar com o uso de uma luz monocromática, colimada e coerente com espectros que vão desde o ultravioleta (300 nm) até o infravermelho (1500 nm). A monocromaticidade do LASER possibilitou a irradiação na faixa espectral adequada à máxima absorção do FS escolhido, assim como a colimação e a coerência oportunizaram a entrega do LASER por meio de dispositivos de fibras ópticas, expandindo as possibilidades de realizar PDT endoscopicamente em órgãos com cavidade como estômago e bexiga. Infelizmente esta tecnologia tem alto custo, o que tem criado barreira à sua utilização (CALIN e PARASCA, 2009; SPYROPOULOS, 2011).

Apesar da criação do LASER, fontes de luzes não-coerentes e com importante componente térmico continuaram a ser criadas e utilizadas na terapia fotodinâmica antimicrobiana, a exemplo das lâmpadas incandescentes, xenônio e halógenas. De modo geral, as lâmpadas utilizadas em PDT apresentam emissão de espectro

contínuo nos comprimentos de onda que vão desde o ultravioleta (lâmpadas de xenônio) até o infravermelho próximo (lâmpadas incandescentes), podendo ser espectralmente filtradas para se adequarem ao espectro de absorção máximo do fotossensibilizador eleito para uso. Além disso, todas apresentam uma alta luminosidade e temperatura, sendo o componente térmico a grande desvantagem de sua aplicabilidade na terapia fotodinâmica. (CALIN e PARASCA, 2009; LERCHE et al, 2016; NAGATA et al, 2012).

Como alternativa às desvantagens do uso de lâmpadas foi criada a luz LED (acrônimo do inglês, Light Emitting Diode), fonte de luz não-colimada e não-coerente que resultam em bandas de emissão espontânea de luz mais amplas, podendo irradiar luz de modo contínuo ou pulsátil. Apresentam muitas vantagens como baixo custo, extensa durabilidade, não geram calor, segura e de fácil manejo tornando-se uma excelente tecnologia para aplicações experimentais e clínicas de terapia fotodinâmica antimicrobiana. Além disso, o LED permite iluminar uma ampla área sem causar dano ao tecido, com adequação de posicionamento sendo, portanto, apropriado a aPDT de lesões infectadas, extensas e tridimensionais de pele com redução do tempo de tratamento. Aprovado pelo FDA para uso em humanos, o LED também tem sido utilizado com sucesso com a finalidade de acelerar processo de reparação tecidual de lesões de pele, graças à sua capacidade de penetrar no tecido sem causar danos e sem emitir calor, assim como por favorecer a angiogênese e produção de colágeno, acelerando o processo de cicatrização de lesões teciduais (BAROLET, 2008; NAGATA et al, 2012; WILSON e PATTERSON, 2008).

Recentemente, o retorno de uma antiga fonte de luz usada em PDT tem sido relatado. A luz do dia, ao invés de uma fonte artificial de luz, tem sido utilizada em uma técnica denominada Daylight-PDT (DL-PDT). Com o espectro visível da luz do dia (400 – 750 nm) é possível ativar fotossensibilizadores que absorvam luz dentro desta faixa espectral. Atualmente, o uso da DL-PDT está aprovado para tratamento de lesões dermatológicas como a queilite actínica, tendo como vantagens, menores custos e redução de efeitos colaterais, especialmente a dor. Tem como desvantagens a localização geográfica, condições climáticas e estações do ano que levam a diferentes taxas de fluência durante a exposição. Na área da Microbiologia, DL-PDT demonstrou resultados significativos no tratamento de lesões cutâneas causadas por

fungos (*Sporothrix schencki*), protozoários (*Leishmania tropica*) e bactérias (*S. aureus*), criando perspectivas para novas pesquisas envolvendo outros microrganismos (GARCÍA-MALINS et al, 2018; NADHMAN et al, 2016; TAMPA et al, 2019; ULLAH et al, 2018) .

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade antimicrobiana e os mecanismos moleculares da ação da curcumina nas concentrações de 5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml irradiada por luz azul LED 450 nm, nas doses de energia de 3,24 J/cm<sup>2</sup>, 5,4 J/cm<sup>2</sup> e 10,8 J/cm<sup>2</sup>, frente a biofilme monoespécie de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar o processo de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*;

Compreender os mecanismos de dano fotoinduzido à bactéria e seu biofilme nos diferentes protocolos instituídos por meio de microscopia confocal de varredura a laser e microespectroscopia Raman.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa *in vitro* do tipo experimental desenvolvida em duas etapas, sendo a primeira desenvolvida no laboratório de Microbiologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia- IMS/UFBA, em Vitória da Conquista, Bahia e uma segunda parte, que se refere aos estudos de microscopia confocal e microespectroscopia Raman realizados no laboratório do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Paulo.

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização da pesquisa, cada grupo experimental foi constituído por 10 corpos de prova (n= 10). Foram delineados 16 grupos experimentais conforme mostrado abaixo (Quadro 1):

GRUPO	TRATAMENTO	SIGLA
<b>Grupo controle negativo</b>	Nenhum tratamento	GC -
<b>Grupo controle positivo</b>	Uso isolado de curcumina nas três distintas concentrações	CUR5µg/ml CUR20µg/ml CUR40µg/ml
	Uso isolado de luz azul LED 450 nm nas três diferentes doses de energia	LED3,24J/cm <sup>2</sup> LED5,4J/cm <sup>2</sup> LED10,8J/cm <sup>2</sup>

<b>Grupo PDT</b>	Uso da curcumina nas três distintas concentrações irradiada por três diferentes doses de energia de luz LED azul 450 nm	PDT5µg/ml-3,24J/cm <sup>2</sup> PDT5µg/ml-5,4 J/cm <sup>2</sup> PDT5µg/ml-10,8 J/cm <sup>2</sup> PDT20µg/ml-3,24J/cm <sup>2</sup> PDT20µg/ml-5,4 J/cm <sup>2</sup> PDT 20µg/ml-10,8 J/cm <sup>2</sup> PDT 40µg/ml-3,24 J/cm <sup>2</sup> PDT 40µg/ml-5,4 J/cm <sup>2</sup> PDT 40µg/ml-10,8 J/cm <sup>2</sup>
------------------	---	---

Quadro 1- Grupos experimentais delineados para a pesquisa.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.3 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Os corpos de prova foram confeccionados com resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (Artigos Odontológico Clássico Ltda, Campo Paulista, SP, Brasil). Ao acrílico autopolimerizante em pó foi adicionado o acrílico autopolimerizante líquido nas proporções indicadas pelo fabricante, cujo produto da mistura foi transferido para uma placa de 96 poços, com espaço interno parcialmente preenchido com gesso, formando espaços com aproximadamente 5mm de altura e 6,4mm de diâmetro, pincelados com solução isolante para acrílico (Dencril Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil) previamente ao recebimento da resina quimicamente ativada. Após a polimerização, os corpos de prova de resina foram retirados da placa, revisados para a ausência de deformidades e fissuras, colocados em tubos de ensaio e cobertos com solução salina para autoclavagem a 121 ° C, por 30min para posterior uso na formação do biofilme.

#### 4.4 ATIVAÇÃO BACTERIANA

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada neste trabalho foi doada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, RJ, Brasil), ATCC 27853, registrada com INCQS 00099 e lote 0516099. Na forma liofilizada, a cepa foi ativada conforme instruções técnicas da Fiocruz, homogeneizada por 1min em agitador de tubos tipo vórtex (Arsec TS200, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) e uma alíquota de 100µl transferida para tubo de ensaio com tampa com rosca, contendo 2 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI), levado para crescimento por 24h em estufa B.O.D na temperatura de  $37 \pm 2$  °C. Após cumprimento do tempo de crescimento, o tubo contendo o microrganismo em caldo BHI foi homogeneizado por 1min em vórtex e uma alíquota de 100 µl foi semeada em placas de Petri contendo meio ágar BHI para crescimento de colônias nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao final das 24h de crescimento em placa de Petri, com o auxílio de alça bacteriológica, as bactérias crescidas em colônias foram acondicionadas em tubos para centrifuga de polipropileno de 2 ml, contendo caldo BHI e glicerol a 15%. Concluída a transferência para os tubos de polipropileno, estes foram armazenados em freezer a - 20 °C para posterior uso no decorrer do experimento.

#### 4.5 CULTIVO BACTERIANO E FORMAÇÃO DO BIOFILME

Para o cultivo bacteriano, o tubo de centrifuga de polipropileno de 2 ml contendo *P. aeruginosa* em caldo BHI e glicerol foi retirado do freezer e descongelado em temperatura ambiente para reativação em cada ciclo do experimento. Após descongelamento, o conteúdo do tubo foi homogeneizado por 1min e, uma alíquota de 100 µl foi transferida para tubo com rosca contendo 2 ml de caldo BHI, levando à estufa B.O.D. em temperatura de  $37 \pm 2$  °C, por 24 horas. Decorrido este tempo, o tubo com rosca foi homogeneizado por 1min e uma alíquota de 100 µl foi semeada em placa de Petri contendo meio ágar BHI, com posterior acondicionamento em

B.O.D, no tempo e temperatura já descritos. Ao final deste intervalo de tempo foi realizada coloração de Gram para descartar a possibilidade de contaminação da amostra, seguida da coleta de alçadas de colônias da bactéria cultivada, sendo depositadas em tubo com tampa com rosca, contendo 10ml de solução salina, seguida de homogeneização em vórtex por 1 minuto. Deste volume homogeneizado, 2 ml foram retirados e introduzidos em cubeta de quartzo para proceder a quantificação em espectrofotômetro Spectrum SP 2000 UV (Shanghai Spectrum Instruments Co. Ltda, Shanghai, China) para a obtenção de uma suspensão de  $5 \times 10^6$  UFC's de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para a formação do biofilme foram utilizadas placas de cultura de células com 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Zurich, Suíça), sendo cada poço preenchido com 2 ml de caldo BHI e a eles adicionados 100 µl da solução bacteriana anteriormente quantificada e um corpo de prova em cada poço da placa. Em seguida, as placas foram levemente agitadas e então transferidas para estufa B.O.D com temperatura de 35 - 37 °C, onde permaneceram durante 7 dias, tempo necessário para a formação de biofilme maduro e mais denso. Neste intervalo de tempo, a cada 2 dias, as condições nutricionais e de crescimento foram avaliadas e os poços suplementados com caldo BHI conforme necessidade observada.

#### 4.6 PREPARO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

Para os experimentos dos grupos em que somente a curcumina foi utilizada e grupos PDT foram preparadas diferentes concentrações do fotossensibilizador [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] (PDT Pharma Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA, Cravinhos, SP, Brasil). Para a constituição de uma solução-mãe de curcumina, 0,01 g de curcumina foi pesada em balança analítica e, em ambiente isento de luz, diluída em 10 ml de álcool absoluto PA, acrescidos 2 ml de tween 80 e, em seguida, vertidos em balão volumétrico de 100 ml devidamente coberto por papel alumínio e completado o volume com água destilada estéril. A partir desta solução-mãe foram preparadas as três diferentes

concentrações. Para a solução de curcumina 5 µg/ml, 5 ml da solução-mãe foram aspirados e vertidos em um balão volumétrico de 100 ml devidamente coberto com papel alumínio e completado com água destilada até a marca (menisco). Este mesmo processo se repetiu para as outras duas concentrações diferindo apenas na quantidade aspirada da solução-mãe. Para a solução de curcumina de 20 µg/ml, aspirou-se 20 ml e para a solução de curcumina na concentração de 40 µg/ml, 40 ml de solução-mãe foram aspirados. Após diluição, a solução de curcumina foi filtrada através de um filtro de membrana PES para seringa de 0,22 µm (TPP Techno Plastic Products AG, Zurich, Suíça), em vidraria estéril protegida da luz com papel alumínio para uso imediato.

#### 4.7 PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO

Para a irradiação dos corpos de prova nos grupos em que somente o LED foi utilizado e nos grupos PDTs, o equipamento empregado foi a Biotable RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), um equipamento emissor de luzes do tipo LED no espectro do vermelho, azul e verde. Para este experimento, a luz utilizada foi a azul com irradiância de 18 mW/cm<sup>2</sup>, nos tempos de 180s, 300s e 600s, correspondendo às doses de energia de 3,24 J/cm<sup>2</sup>, 5,4 J/cm<sup>2</sup> e 10,8 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

#### 4.8 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Após sete dias de crescimento do biofilme, por meio de pinças estéreis individuais, cada corpo de prova foi transferido para um poço de placa de cultura de células com 24 poços, contendo 2 ml de solução salina e lavados por 10s para remoção do excesso do meio de cultura e de células fracamente aderentes com posterior transferência para outra placa para receber o tratamento experimental.

Nos grupos experimentais de PDT, após lavagem e deposição em nova placa de cultura de células, os corpos de prova foram cobertos com 2 ml de solução de curcumina na concentração definida para cada grupo experimental, com tempo de pré-irradiação de 5min, com placa protegida da exposição à luz. Decorrido este tempo, cada corpo de prova foi retirado da placa onde esteve em contato com a curcumina e transferido para outra placa de 24 poços para receber irradiação de luz LED azul pelos diferentes tempos (180s, 300s e 600s) definidos para cada experimento. Ao término do tempo de exposição ao LED, os corpos de prova foram retirados da placa com o auxílio de pinças estéreis e depositados em tubo de centrífuga de polipropileno de 2 ml contendo 1000µl de solução salina, sendo agitados em vórtex por 1min para o desprendimento das células bacterianas, obtendo-se uma suspensão pura. A partir da suspensão pura procedeu-se às diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , sendo 100µl de cada diluição semeada em duplicata em placas de Petri contendo meio ágar BHI. As placas semeadas e devidamente identificadas com nome do grupo experimental e diluição eram incubadas em B.O.D. por 20h, tempo de incubação em que a contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) foi possível, pois ao exceder este tempo ocorriam confluência das colônias impedindo sua contagem. A contagem das UFC/ml foi realizada com o auxílio de um contador de colônias (PHOENIX CP 608, Araraquara, SP, Brasil).

O grupo controle negativo, em que nenhum tratamento foi implementado e os grupos controle positivo tratados isoladamente com LED azul ou curcumina foram incorporados ao estudo, sendo processados da mesma forma acima descrita.

#### 4.9 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Para as análises de microscopia confocal não foram utilizados marcadores sendo, a fluorescência do micorganismo associado à curcumina, suficientes para a geração de imagens que possibilitaram o estudo das alterações estruturais dos biofilmes tratados com os protocolos de PDTs em que efeitos antibacterianos foram observados. As imagens foram obtidas por meio de microscópio de fluorescência

confocal invertido Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com filtros de emissão (469 - 596 nm), usando lentes objetivas 10x com geração de uma sequência de imagens por meio do software Zen 2010 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

#### 4.10 MICROESPECTROSCOPIA RAMAN

Espectros Raman dos biofilmes maduros de *P. aeruginosa* foram medidos pelo microscópio WITec Alpha 300 RAS (WITec, Ulm, Alemanha), com comprimento de onda de excitação de 785 nm e faixa de detecção de 100 - 3200  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram coletados com objetiva de 20x de ampliação de ar (Zeiss, Jena, Alemanha) e foram registrados com um tempo de integração de 60s e duas acumulações para cada espectro, seguidas de dez espectros coletados de diferentes partes do biofilme que foram utilizados para análise posterior. Os espectros obtidos foram processados usando o software WITec Project FOUR e Origin 2016.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da efetividade antibacteriana dos diferentes protocolos de aPDT aplicados neste estudo, os dados referentes às UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* foram transformados em  $\log_{10}$ , sendo posteriormente procedida a análise estatística. Grupos de análises foram montados tendo como base a concentração de curcumina, a dose de energia e grupos PDTs entre si. Com o uso do programa GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), cada um destes blocos foi submetido ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e homogeneidade das variâncias de Bartlett. Para os blocos de análise que tiveram os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias atendidos foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, com intervalo de confiança de 95% ( $p$  valor  $< 0,05$ ) e pós-teste de Bonferroni para estabelecer comparativos entre os grupos. Para os demais grupos

de análises, os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias não foram atendidos, sendo utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95% ( $p$  valor  $< 0,05$ ) e pós-teste de Dunn para comparação estatística entre os grupos.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **The Biochemical journal**, 473(4), 347-64, 2016.

ALAYANDE, A. B.; AUNG, M. M.; KIM, I. S. Correlation Between Quórum Sensing Signal Molecules and *Pseudomonas aeruginosa* 's Biofilm Development and Virulency. **Curr Microbiol**, 75(7):787-793, 2018.

ALLEGIANZI, B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, 377, 228-241, 2011.

ALMEIDA, P. P.; PEREIRA, I. S.; RODRIGUES, K. B. Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice. **Laser Med. Sci.** 32, 1337-1342, 2017.

AMIN, R. M. et al. Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: new approach. **Photochem. Photobiol. Sci**, 11, 1156, 2012.

AMIRMOZAFARI, N.; FALLAH MEHRABADI, J.; HABIBI A. Association of the Exotoxin A and Exoenzyme S with antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Arch Iran Med**, 19(5): 353 – 358, 2016.

ANDRADE, M. C. et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Arch Oral Biol**. 58(2):200-10, Feb, 2013.

ANTUNES, L. C. et al. Quórum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, 156 (8):2271-82, 2010.

ARAÚJO, T. S. D. et al. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 21:219-223, mar, 2018.

ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R. Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I- and photofrin-II-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes. **J Invest Dermatol**.90(5):652-7, may, 1998.

AZGHANI, A. O. *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastases and exotoxin A. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 15(1), 132–140, 1996.

AZGHANI, A. O. et al. Mechanism of fibroblast inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* elastases. **Microbiology**, 160(Pt 3), 547-55, 2014.

BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008, 239p.

BALLOY, V. et al. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Dis**, 196(2):289–296, 2007.

BAPTISTA, M. S. et al. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. **Photochem Photobiol**, 93(4): 912–919, jul, 2017.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Semin Cutan Med Surg**. 27(4):227-38, Dec, 2008.

BODELÓN, G. et al. Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. **Nature materials**, vol. 15,11, 1203-1211, 2016.

BOU, R et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J Hosp Infect**, 71:138–142, 2009.

CALIN, M. A.; PARASCA, S.V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers Med Sci**. 24(3):453-60, May, 2009.

CARVALHO, D. M. et al. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology**, 35(1), 115-119, 2015.

CASILAG, F. et. al. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. **Infect Immun**, 84(1): 162–71, 2016.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 1(4), 279–293, 2004.

CIOFU, O. et al. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. **Microbiology**, 154: 103–13, 2008.

CONRAD, J. C. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 163, p. 619-629, 2012.

COOKSEY, C. J. Turmeric: old spice, new spice. **Biotechnic & Histochemistry**, 92(5): 309-314, 2017.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, 284:1318-1322, 1999.

COWELL, B. A.; EVANS, D. J.; FLEISZIG, S. M. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. **FEMS Microbiol Lett.** 1;250(1):71-6, 2005.

DAHL, T. A.; BELSKI, P.; REZKA, K. J. et al. Photocytotoxicity of curcumin. **J. Photochem. Photobiol.** 59, 290-2940, 1994.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg.** 61(5):340-8, may, 1991.

DARLENSKI, R.; FLUHR, J.W. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. **J. Biomed. Opt.**, 18(6):061208, jun, 2013.

DAVIES, D. G.; MARQUES, C. N. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. **Journal of bacteriology**, 191(5), 1393-403, 2009.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, 90(12), 889-905, 1998.

DOVIGO, L. N. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers Surg Med.**43(9):927-34, Nov, 2011.

D'SOUZA, S. P. et al. Pharmaceutical Perspectives of Spices and Condiments as Alternative Antimicrobial Remedy. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, 22(4), 1002-1010, 2017.

ESPÓSITO, S.; DE SIMONE, G. Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. **Le Infezioni in Medicina**. n. 4, 301-310, 2017.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: **ECDC**; 2013.

FAURE, E.; KWONG, K.; NGUYEN, D. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections: how to adapt within the host? **Front. Immunol**, 9:2416, oct 22, 2018.

FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M. A. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. **J Invest Dermatol**.32(2, Part 2):229-31, Fev, 1959.

FOTINOS, N. et al. Effects on Gram-negative and Gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic Acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 52(4), 1366-7, 2008.

FRESCHI, L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer and pathogenicity. **Genoma Biol Evol**, 1;11(1):109-120, 2019.

GARCIA, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. **Virulence**, 9(1), 1163-1175, 2018.

GARCÍA-MALINIS, A. J. et al. Cutaneous sporotrichosis treated with methylene blue-daylight photodynamic therapy. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 32(3):e90-e91, Mar, 2018.

GEORGESCU, M. et al. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. **BMC infectious diseases**, 16(Suppl 1): 92, 2016.

GESSARD, C. Sur colorations bleue et verte des linges à pansements. **Comptes rendus hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences**, 94: 536-538, 1882.

GLOAG, E. S. et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110 (28), 11541-6, 2013.

GOLLMER, A. et al. Real-time imaging of photodynamic action in bacteria. **J Biophotonics**. 10(2):264-270, Feb, 2017.

GØTZSCHE, P C. Niels Finsen's treatment for lupus vulgaris. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 04,1: 41-2, 2011.

GOULART R. C. et al. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomed Laser Surg**, 28 Suppl 1:S85-90, aug, 2010.

GUPTA, P. et al. Emerging Biocide Resistance among Multidrug-Resistant Bacteria: Myth or Reality? A Pilot Study. **J Pharm Bioallied Sci.** 10(2):96-101, 2018.

GUPTA, S. C. et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, 39,3: 283-99, 2012.

HAMBLIN M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current opinion in microbiology**, 33, 67-73, 2016.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Inorganic Salts and Antimicrobial Photodynamic Therapy: Mechanistic Conundrums? **Molecules** (Basel, Switzerland), 23(12), 3190, 2018.

HEIDARY, Z. et al. Virulence genes profile of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian children with UTIs. **Acta. Med. Iran**, 54(3): 201-210, 2016.

HOANG, S. et al. Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. **PLoS One**, 9;13(3): e0193300, mar, 2018.

HONG, Y. Q.; GHEBREHIWET, B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastases and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. **Clin Immunol Immunopathol**, 62(2):133-8, 1992.

HOSPENTHAL, M. K.; COSTA, T. R. D.; WAKSMAN, G. A. Comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Micro**, 15(6):365–79, 2017.

HU, J. et al. Photodynamic inactivation of *Burkholderia cepacia* by curcumin in combination with EDTA. **Food Res Int.**111:265-271, sep, 2018.

HUANG, L. et al. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. **ACS infectious diseases**, 3(4), 320-328, 2017.

\_\_\_\_\_. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Lasers in surgery and medicine**, 44(6), 490-9, 2012.

HUBER, P. et al. Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. **Cell Mol Life Sci.**71(10):1927-41, 2014.

HUGH, R.; LESSEL, E.F. *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas pyocyanea*? **International Journal of Systematic Bacteriology**, 17(1):43-51, 1967.

JACKSON, C.L.; MENKE, A.E. On Certain Substances Obtained from Turmeric. I. Curcumin. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**, Vol. 17), pp. 110-124, Jun, 1881.

JAFFAR-BANDJEE, M. C. et al. Production of elastases, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of clinical microbiology**, 33(4), 924–929, 1995.

JEONG, S. J. et al. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 80(2):130-5, oct, 2014.

JUNG, G. B. et al. Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. **Biomed Opt Express**. 28;5(9):3238-51, 2014.

KAMATH, S.; KAPATRAL, V.; CHAKRABARTY, A. M. Cellular function of elastases in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. **Mol Microbiol**, 30(5):933-41, 1998.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **J. Dent. Res.** 89: 205–218, 2010.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol Mol Biol Ver**, 73(2):310-47, 2009.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57:13, 2889-2895, 2017.

KOROSSY, A.; BLÁZOVICS, A. Ajuveda in modern medical science. **Orv Hetil.** 29;157(22):873-6, May, 2016.

KUANG, Z. et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastases provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-a. **Plos One**, 6(11): e27091, 2011.

LAU, G. W. et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. **Infect Immun**, 72:4275-8, 2004.

LE BERRE, R. et al. Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Microbiol Infect.**, 14(4):337-43, 2018.

LEID, J. G. Bacterial biofilms resist key host defenses. **Microbe**, 4:66–70, 2009.

LEID, J. G. et al. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. **J Immunol.**, 1;175(11):7512-8, 2005

LERCHE, C. M. et al. Alternatives to Outdoor Daylight Illumination for Photodynamic Therapy--Use of Greenhouses and Artificial Light Sources. **International journal of molecular sciences**, 17(3), 309, 2016.

LI, T. et al. Pyocyanin induces NK92 cell apoptosis via mitochondrial damage and elevated intracellular Ca<sup>2</sup>. **Innate Immun.**25(1):3-12, 2019.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTESTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo, Ed. Atheneu, 5<sup>a</sup> ed,2008, pg 369-381.

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of clinical and translational research**, 1,3:140-167, Dec, 2015.

LUCENA, A. et al. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **J Hosp Infect.** 87 (4): 234-40, 2014.

MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N. Engl. J. Med.** 370, 1198-1208, 2014.

- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, 18(3), 268 – 281, 2012.
- MAHDI, Z. et al. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Laser therapy**, 24(2),103-11, 2015.
- MCCREADY, A. R. et al. Structural determinants driving homoserine lactone ligand selection in the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing receptor. **Proc Natl Acad Sci**, 2;116(1):245-254, 2019.
- MENSA, J. et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. **Rev Esp Quimioter**.31(1):78-100, 2018.
- MOAN J. Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. **Cancer Lett.**, 33(1):45-53, Oct, 1986.
- MORALES, E. et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **BMC Health Serv Res**, 23;12:122, 2012.
- MORATA, L. et al. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Antimicrob Agents Chemother**, 56(9):4833-7, 2012.
- MULCAHY H.; CHARRON-MAZENOD. L.; LEWENZA, S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. **Environmental Microbiology**, 12(6), 1621–1629, 2010.

NADHMAN, A. et al. Annihilation of Leishmania by daylight responsive ZnO nanoparticles: a temporal relationship of reactive oxygen species-induced lipid and protein oxidation. **International journal of nanomedicine**, 11, 2451–2461, 2016.

NAGANO, T. et al. Stimulatory effect of pseudomonal elastases on collagen degradation by cultured keratocytes. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**,42(6):1247-53, 2001.

NAGATA, J. Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, 9(2):122-3, Jun, 2012.

NAJAFI, S.; KHYAMZADEH, M.; PAKNEJAD, G. et al. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-Based Photodynamic Therapy and chlorhexidine on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Lasers Med. Sci.** 7, 21-25, 2016.

NASIRMOGHADAS, P. et al. Evaluation of biofilm formation and frequency of multidrug-resistant and extended drug-resistant strain in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Isfahan. **Adv Biomed Res**, 7:61, 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. Disponível em :< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 20 Jan, 2019.  
NIJLAND, R.; HALL, M. J.; BURGESS, J. G. Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. **PLoS ONE**, 5(12): e15668, 2010.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol B.**, 39(1):1-18, May, 1997.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, 30(2), 295–30, 1998.

PADDOCK, S. W.; ELICEIRI, K. W. Laser Scanning Confocal Microscopy: History, Applications, and Related Optical Sectioning Techniques. **Methods in Molecular Biology**, 1075: 9-47, 2014.

PALAVUTITOTAI, N. et al. Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **PLoS One**, 22;13(2), 2018.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, 12(6):1377-1383, 2010.

\_\_\_\_\_. *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2015.

PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 10(3):313-9, Sep, 2013.

PASSADOR, L. et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**. 21;260(5111):1127-30, 1999.

PÄTZOLD, R.; KEUNTJE, M.; ANDERS-VON AHLFTEN, A. A. New approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. **Anal Bioanal Chem**, 386(2):286-92, 2006.

PINTO, J. G. et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci**.31(5):883-90, Jul, 2016.

POURNAJAF, A. et al. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Le Infezioni in Medicina**, 3: 226-236, 2018.

RAAB O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Zeitung Biol.**, 39:524–526, 1900.

RANGEL, S. M. et al. The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. **PLOS Pathogens**, 11(6): e1004945, 2015.

REGO-FILHO, F. G. et al. Validation of photodynamic action via photobleaching of a new curcumin-based composite with enhanced water solubility. **J. Fluoresc.**24(5):1407-13, Sep, 2014.

REIHILL, J. A. et al. Bacterial proteases and haemostasis dysregulation in the CF lung. **J Cyst Fibros.**, 16(1):49-57, 2017.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers Med Sci.** 30:549–559, 2015.

ROSA, L. P. et al. Application of photodynamic therapy, laser therapy and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: a case report. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** 19, 235-238, 2017.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A new therapeutic option to combat infections. **J.Med.Microb.Diagn.**3(4), 2014.

RUFFIN M.; BROCHIERO E. Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. **Front Cell Infect Microbiol.** 31 (9),182, May 2019.

SAINT-CRIQ, V. et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. **Thorax.** 73(1), 49-61, 2017.

SARKISOVA, S. A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* EF-hand protein, EfhP (PA4107), modulates stress responses and virulence at high calcium concentration. **PLoS One.** 11;9(2):e98985, Jun, 2014.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J. Bacteriol,** 1841140-1154, 2002.

SAWA, T. et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical care.**18(6), 668, 2014.

SCALFI-HAPP, C. et al. Confocal Raman microscopy as a diagnostic tool for investigation of living neuroblastoma tumour cells. **Med. Laser Appl.,** 22, 157–164, 2007.

SCHUSTER, M. et al. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. **Journal of bacteriology,** 185(7), 2066-79, 2003.

SHARMA, S. K.; CHIANG, L. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? **Nanomedicine,** 6(10), 1813–1825, 2011.

SKARIYACHAN S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiol (Praha)**, 63(4):413-432, Jul 2018.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, 8(2), 108–120, 2013.

SPYROPOULOS, B. 50 years LASERS: in vitro diagnostics, clinical applications and perspectives. **Clin Lab.**, 57(3-4):131-42, 2011.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**.406:959–964, 2000.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxid Redox Signal**. 10(3):511-45, Mar, 2008.

TAJ, A. et al. Prevalence of common nosocomial organisms in surgical Intensive Care Unit in North India: A hospital-based study. **Int.J. Crit. Illn. Inj. Sci.** 8(2):78-82, 2018.

TAMPA, M. et al. Photodynamic therapy: A hot topic in dermatology. **Oncology letters**, 17(5), 4085–4093, 2019.

VASSENA, C. et al. Photodynamic antibacterial and antibiofilm activity of RLP068/CI against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* forming biofilms on prosthetic material. **Int J Antimicrob Agents**. 44 (1): 47-55, JUL, 2014.

VON TAPPEINER, H. A.; JODLBAUER, A. Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die Photodynamische Erscheinung. **F.C.W. Vogel**, 1907.

TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 80:1, 7-12, 2016.

TRAUGOTT, K. A. et al. Monotherapy or combination therapy? The *Pseudomonas aeruginosa* conundrum. **Pharmacotherapy**, 31(6):598-608, 2011.

TURNBULL, L. et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. **Nature communications**, 7, 11220, 2016.

ULLAH, A. et al. Household light source for potent photo-dynamic antimicrobial effect and wound healing in an infective animal model. **Biomedical optics express**, vol. 9,3 1006-1019, Feb. 2018.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, 42:13–28, 1998

\_\_\_\_\_. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? **The Lancet. Infectious diseases**, 17(2), e49–e55, 2016.

WALTERS, M. C., 3rd et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrob Agents Chemother**. 47(1):317-23, Jan, 2003.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area. **Nature**. 15, 551(7680): 313–320, 2017.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys Med Biol**, 7;53(9):R61-109, May, 2008.

WOLFGANG, M. C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101(17), 6664-8, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Acesso em: 20 de janeiro de 2018. Em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> 2017.

\_\_\_\_\_. Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. World Health Organizations. Acesso em: 20 de janeiro de 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/>, 2009.

\_\_\_\_\_. Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016 - 2018 Early implementation. Acesso em: 15 de março de 2019. Disponível em: [https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/oms-amr-amc-report-2016-2018](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018), 2018.

WU, J. et al. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 15:34-9, Sep, 2016.

YAHR, T. L. et al. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 95(23), 13899-904, 1998.

YANG, J. et al. Mechanistic insights into elastin degradation by pseudolysin, the major virulence factor of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific reports**, 5, 9936, 2015.

YIN, R.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. **Curr Med Chem**. 22(18):2159-85, 2015.

ZHAO, R. Z.; ZHENG, Y. J.; CHEN, Q. Carriage of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and prognosis after infection. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**, 50(9):672-7, 2012.

## CAPÍTULO 1

**TÍTULO:** Disruptura de biofilme maduro de *Pseudomonas aeruginosa* por terapia fotodinâmica antimicrobiana.

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o efeito antimicrobiano e investigar a ação de mecanismos moleculares da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mediada por curcumina frente a biofilme maduro de *P. aeruginosa*. **Materiais e métodos:** Biofilmes maduro de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foram submetidos a protocolos de aPDT mediada por curcumina em distintas concentrações ((5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml), ativada por luz LED em diferentes doses de energia ((3,24 J/cm<sup>2</sup>, 5,4 J/cm<sup>2</sup> e 10,8 J/cm<sup>2</sup>) e comparados a grupos controle negativo (sem tratamento) e grupos controle positivos (LED e curcumina isolados). Para avaliar o efeito antimicrobiano foi utilizada técnica microbiológica de contagem de UFC/ml, transformadas em Log<sub>10</sub>, com análise estatística realizada por meio de testes paramétrico Anova e não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Bonferroni e Dunn, respectivamente. O estudo da estrutura do biofilme de *P. aeruginosa* e da ação dos mecanismos moleculares da curcumina sobre esta estrutura foram realizados com a utilização das ferramentas analíticas microscopia confocal de varredura a LASER e microespectroscopia Raman. **Resultados:** Os resultados demonstraram uma ação centrada no efeito disruptivo do biofilme, além de redução estatisticamente significativa (p valor < 0,05) do crescimento bacteriano em todos os protocolos de aPDT testados, com resultados dependentes da concentração e doses de energia utilizadas. **Conclusão:** a aPDT mediada por curcumina avaliada nesta pesquisa mostrou-se capaz de reduzir o crescimento bacteriano e, principalmente, de exercer efeito antibiofilme, tornando-a uma promissora terapia potencializadora da ação de antimicrobianos.

**Palavras-chaves:** *Pseudomonas aeruginosa*, aPDT, LED, curcumina, biofilme, disruptura

## INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é reconhecidamente um grave problema de saúde pública mundial que exige a implementação de estratégias de prevenção e controle das infecções, não se limitando à produção de novos antimicrobianos para os quais, patógenos nosocomiais de importância clínica conseguem criar em tempo hábil complexos mecanismos de resistência, constituindo um sistema de retroalimentação ao já grave panorama de resistência às drogas antimicrobianas.<sup>1</sup> Neste cenário destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa, oportunista, aderente a superfícies inertes e em tecidos vivos, com alta versatilidade metabólica e capacidade de formação de biofilmes densos, condições que favorecem o desenvolvimento de fenótipos resistentes a antibióticos.<sup>2,3</sup> Baixas concentrações de oxigênio e escassez de nutrientes no interior do biofilme reduzem a atividade metabólica das células bacterianas, conduzindo-as ao crescimento estacionário o que pode restringir a atividade antibacteriana de certas drogas. Além disso, penetração limitada de certos antibióticos, ação de componentes da matriz extracelular e presença de enzimas como  $\beta$ -lactamase dentro do biofilme também são apontados como fatores que contribuem para a resiliência de biofilmes frente à ação de antimicrobianos.<sup>4,5</sup>

A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana é considerada um promissor método de tratamento antimicrobiano, incluindo cepas multirresistentes ou englobadas em matriz de biofilme. Além da ação antimicrobiana direta, a aPDT também age sobre a matriz de biofilme e seus componentes responsáveis por sua estabilidade estrutural.<sup>6-8</sup> Trata-se de uma técnica em que a luz é utilizada para ativar compostos químicos chamados fotossensibilizadores que ao interagir com o oxigênio molecular produzem espécies reativas de oxigênio que causam danos oxidativos ao microrganismo, levando-o à morte, bem como disruptura do biofilme, propiciando um efeito sinérgico à ação de antimicrobianos e fotossensibilizadores.<sup>9-11</sup>

Embora exista uma crescente e diversificada rota sintética de drogas fotoativas quimicamente alteradas com o propósito de potencializar o dano fotoinduzido, o uso de fotossensibilizadores naturais como a curcumina vêm sendo evidenciada como uma nova perspectiva na aPDT, com baixa toxicidade e resultados igualmente

significativos.<sup>6,12,13</sup> Nas últimas décadas, o uso de importantes ferramentas como a microscopia confocal de varredura a LASER (CSLM) e a microespectroscopia Raman têm sido empregadas nos estudos da efetividade da aPDT e da antibioticoterapia frente a *Pseudomonas aeruginosa*, ressaltando a ação dinâmica intracelular induzida por fotossensibilizantes e antibióticos, sua difusão dentro da célula e análise da ação de quórum sensing em biofilme.<sup>14-17</sup>

Apesar da ação promissora da curcumina em aPDT e dos avanços tecnológicos na área da microscopia, até o presente momento, não existem estudos publicados que avaliem a ação deste FS em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar o efeito antimicrobiano e investigar a ação de mecanismos moleculares da aPDT mediada por curcumina frente a biofilme maduro de *Pseudomonas aeruginosa*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Confecção dos corpos de prova**

Os corpos de prova foram confeccionados com resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (Artigos Odontológico Clássico Ltda, Campo Paulista, SP, Brasil), misturando acrílico autopolimerizante em líquido e em pó, conforme instruções do fabricante.

### **Estirpe bacteriana e formação de biofilme**

Cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, registrada com INCQS 00099 e lote 0516099 (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em caldo BHI, incubada em estufa B.O.D. a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24h. Para a formação do biofilme foram utilizadas placas de cultura de células com 24 poços preenchidos com 2 ml de caldo BHI, adicionados 100  $\mu\text{l}$  de suspensão padrão de *P. aeruginosa* a  $5 \times 10^6$  UFC/ml e um corpo de prova, sendo incubada em B.O.D. a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 7 dias.

## **Fotossensibilizador**

Diferentes concentrações de curcumina (5 µg/ml, 20 µg/ml e 40 µg/ml) foram preparadas a partir de uma solução-mãe constituída pelo FS diluído com álcool absoluto PA e tween 80.

## **Parâmetros de irradiação**

A luz utilizada foi o LED azul 450 nm com irradiância de 18 mW/cm<sup>2</sup>, nos tempos de 180s, 300s e 600s, correspondendo às doses de energia de 3,24 J/cm<sup>2</sup>, 5,4 J/cm<sup>2</sup> e 10,8 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

## **Condições experimentais**

Os corpos de prova de todos os grupos experimentais foram lavados com 2 ml de solução salina, por 10s para remoção do excesso do meio de cultura e de células fracamente aderentes. Após lavagem, os corpos de prova dos grupos experimentais de PDT foram incubados com curcumina por um tempo de pré-irradiação de 5min e posteriormente, irradiados com LED azul. Após tratamento, os corpos de prova foram depositados em tubo de centrífuga de polipropileno de 2 ml, agitados, obtendo-se suspensões puras, a partir das quais se procederam as diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>, sendo 100 µl de cada diluição semeada em duplicata em placas de Petri contendo meio ágar BHI e incubadas em B.O.D por 20h, a 37 ± 2 °C, seguida de contagem de UFC/ml.

O grupo controle negativo (GC-), em que nenhum tratamento foi implementado e, os grupos controle positivo LED azul e curcumina isolados foram incorporados ao estudo, sendo processados da mesma forma acima descrita.

## **Microscopia confocal de varredura a LASER (CSLM)**

As imagens foram obtidas por meio de microscópio de fluorescência confocal invertido Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com filtros de emissão

(469-596 nm), usando lentes objetivas 10X e geração de uma sequência de imagens por meio do software Zen 2010 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

### **Microespectroscopia Raman**

As medições de espectro Raman do biofilme maduro foram realizadas no microscópio WITec Alpha 300 RAS (WITec, Ulm, Alemanha), no comprimento de onda de excitação de 785 nm e faixa de detecção de 100 - 3200  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram coletados com objetiva de 20x de ampliação de ar (Zeiss, Jena, Alemanha) e registrados com tempo de integração de 60s e duas acumulações para cada espectro, no total de dez espectros coletados de diferentes partes do biofilme para análise posterior. Os espectros obtidos foram processados usando o software WITec Project FOUR e Origin 2016.

### **Análise estatística**

Para a avaliação da efetividade dos protocolos de aPDT, os dados referentes às UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* foram transformados em  $\log_{10}$ , sendo submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e homogeneidade das variâncias de Bartlett. Para as análises estatísticas foram utilizados testes Anova e Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95% ( $p$  valor  $< 0,05$ ) e pós-teste de Bonferroni e Dunn, respectivamente.

## **RESULTADOS**

### **Avaliação do efeito antimicrobiano da PDT mediada por curcumina segundo sua concentração.**

Nos grupos tratados com concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$  de curcumina foram observadas reduções estatisticamente significativas no crescimento bacteriano entre o grupo com curcumina irradiada com a dose de energia de 10,8  $\text{J/cm}^2$  ( $p$  valor  $< 0,05$

e 0,01) em comparação a todos os grupos, exceto quando comparado aos grupo LED 3,24 J/cm<sup>2</sup> e PDT 5 µg/ml- 5,4 J/cm<sup>2</sup> (p valor > 0,05) (Gráfico 1).

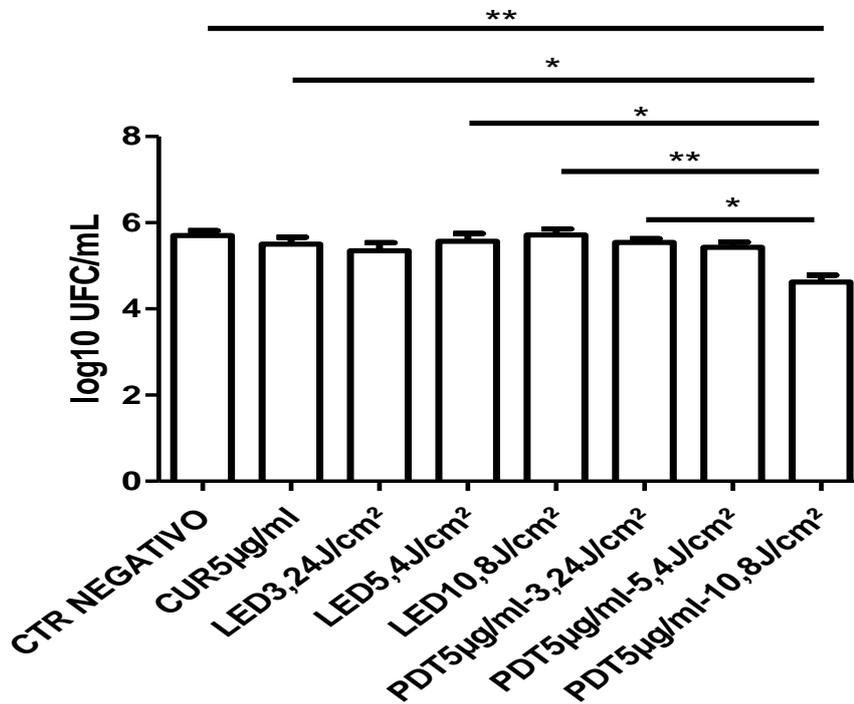


Gráfico 1- Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 5 µg/ml de curcumina.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos grupos em que foi utilizada a concentração de 20 µg/ml de curcumina observou-se diferença estatisticamente significativas na redução da viabilidade bacteriana entre o grupo PDT irradiados com dose de energia de 5,4 J/cm<sup>2</sup> em relação aos grupos LED isolado com a mesma fluência (p valor <0,05), GC- e LED com dose de 10,8 J/cm<sup>2</sup> (p valor <0,01), bem como no grupo PDT, com curcumina ativada por dose de energia de 10,8 J/cm<sup>2</sup> quando comparado aos grupos de LED isolado de mesma dose de energia e GC- (p valor < 0,05) (Gráfico 2).

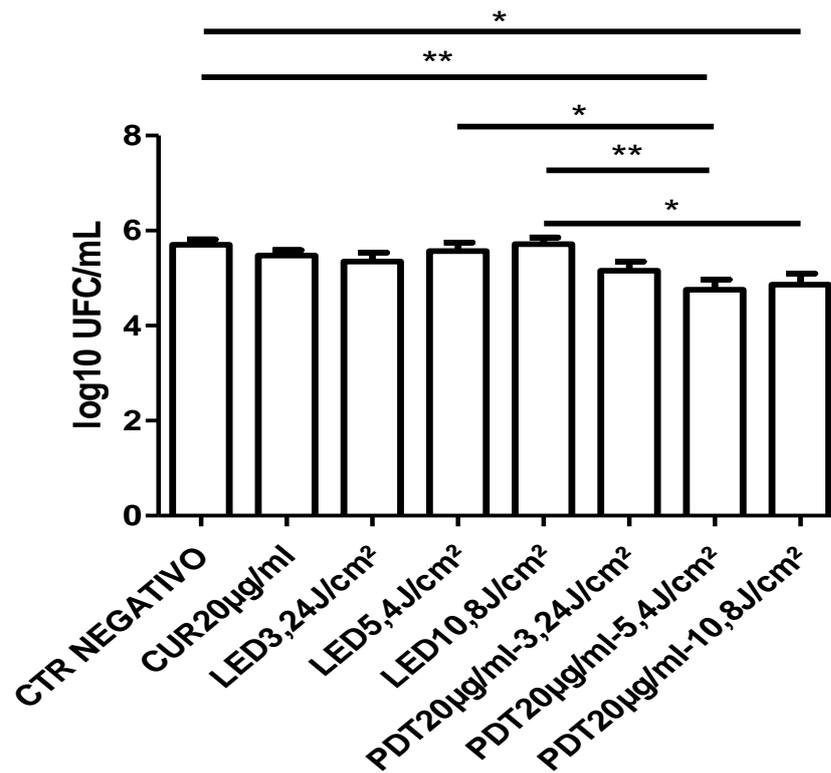


Gráfico 2- Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 20 µg/ml de curcumina.

Fonte: Elaborado pela autora

Para os grupos experimentais tratados com concentração de curcumina de 40 µg/ml, irradiada com 10,8 J/cm<sup>2</sup> observou-se diferença estatística na redução da viabilidade bacteriana quando comparado aos grupos LED 5,4 J/cm<sup>2</sup> (p valor < 0,01) e resultados mais expressivos (p valor < 0,001), quando comparados ao grupo controle e grupo LED 10,8 /cm<sup>2</sup> (Gráfico 3).

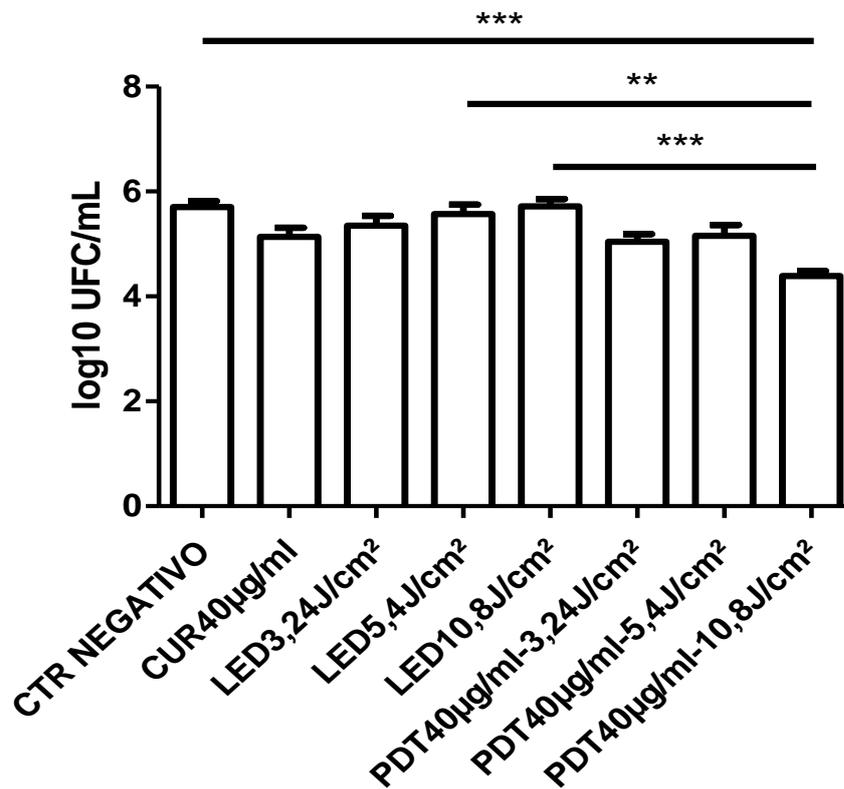


Gráfico 3- Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre os grupos experimentais segundo a concentração de 40 µg/ml de curcumina.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### **Avaliação entre todos os grupos de aPDT.**

Ao avaliar os resultados entre todos os protocolos de PDT, reduções estatisticamente significativas na contagem de UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas entre os grupos PDT 5µg/ml-10,8 J/cm<sup>2</sup> quando comparado à PDT 5µg/ml-3,24 J/cm<sup>2</sup> (p valor < 0,05) e entre PDT 40µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> quando comparada à PDT 5µg/ml- 5,4J/cm<sup>2</sup> (p valor < 0,01) e PDT 5µg/ml-3,24J/cm<sup>2</sup> (p valor < 0,001) (Gráfico 4).

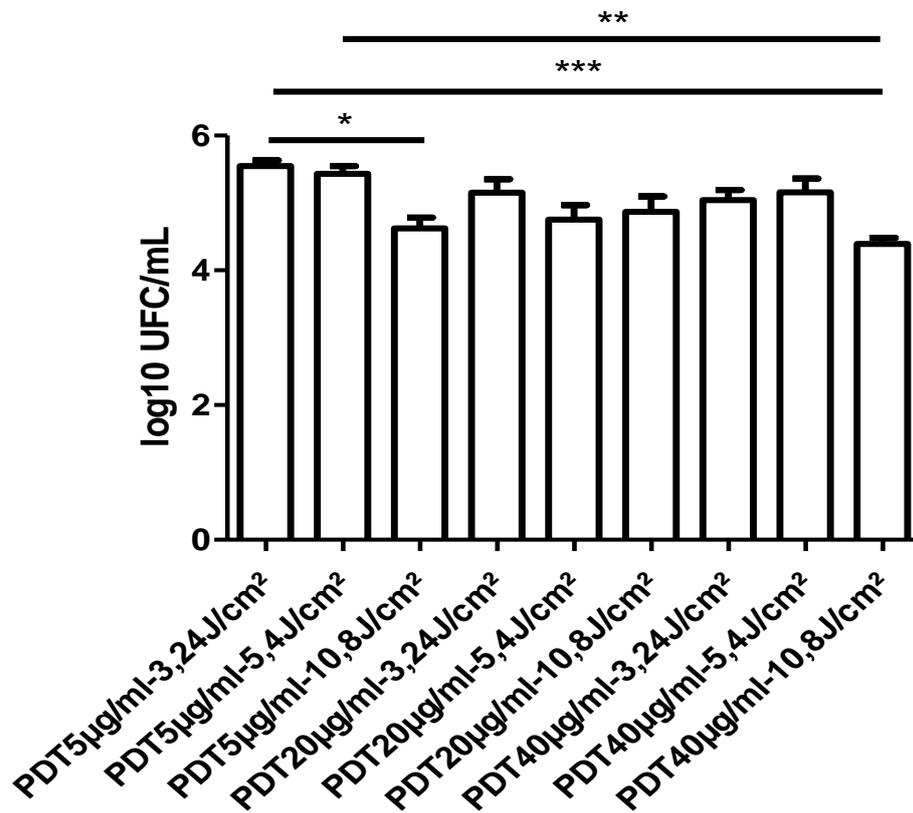


Gráfico 4- Representação gráfica do efeito antimicrobiano entre todos os grupos experimentais de PDT nas diferentes concentrações de curcumina irradiadas por distintas doses de energia.

Fonte: Elaborado pela autora.

### Microscopia confocal de varredura a LASER

Apesar da discreta emissão de fluorescência da cepa de *P. aeruginosa* estuda foi possível observar vários aglomerados de células bacterianas com autofluorescência mais pronunciada, destacadas por setas vermelhas (FIGURA 5a). Quando o corpo de prova foi incubado com o fotossensibilizador na ausência de bactéria, observou-se que a curcumina apresentou um padrão de distribuição ampla, homogênea e mais opacas sobre o mesmo (FIGURA 5b). Porém, ao ser associada ao biofilme, a curcumina mostrou uma alta emissão de fluorescência, tornando os

densos aglomerados de células, com aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de espessura, mais visíveis (FIGURA 5c).

Quanto à degradação de curcumina utilizadas no experimento foi possível observar que na sua menor concentração, a dose de energia mais alta (10,8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) foi capaz de degradá-la completamente (FIGURA 5d). No entanto, nas concentrações mais altas (20 e 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), percebe-se áreas verdes, opacas e de distribuição homogênea possivelmente relacionadas a curcumina não degradada pela mesma dose de energia utilizada (Figura 5e-f).

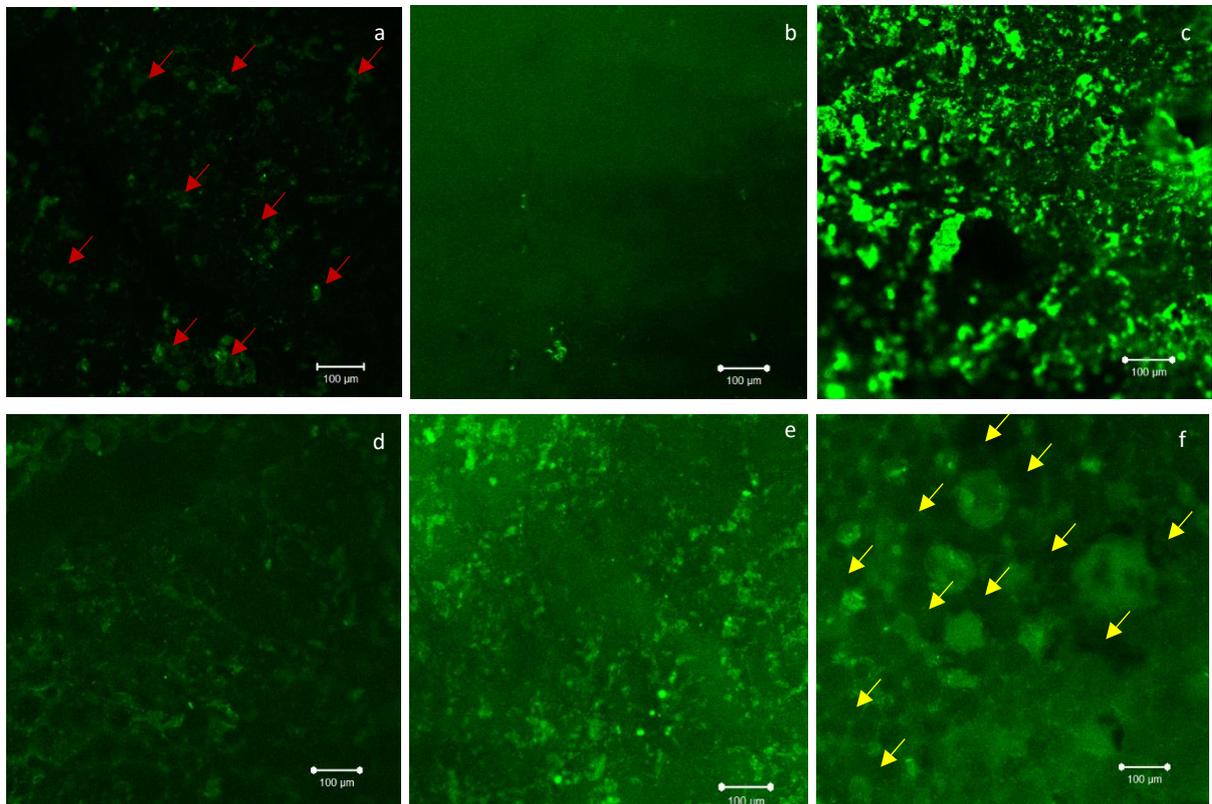


Figura 5- Sequência de imagens de geradas por CSLM para avaliação da estrutura de biofilme de *P. aeruginosa* antes e após aPDT.

As imagens mostram o padrão de autofluorescência do biofilme (a), da curcumina (b) e do biofilme incubado com curcumina (c), permitindo avaliar a degradação de curcumina, efeitos antimicrobianos e disruptura do biofilme nas PDT 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10,8 $\text{J}/\text{cm}^2$  (d), PDT 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10,8 $\text{J}/\text{cm}^2$  (e) e PDT 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10,8 $\text{J}/\text{cm}^2$  (f).

Fonte: Elaborada pela autora

Quando o critério de análise é a autofluorescência e agrupamento de células bacterianas no biofilme fica evidente que a emissão de fluorescência diminui significativamente nos três grupos de PDT (FIGURA 5d-f) quando comparados à imagem do biofilme incubado com curcumina (FIGURA 5c). Este mesmo comparativo permite observar menores agregados de células nas imagens do grupo PDT 20 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> e PDT 40 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> (FIGURAS 5e-f). Mais especificamente, no grupo PDT 20 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup>, a desestruturação do biofilme é mais superficial, ao passo que, o grupo PDT 40 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> apresenta uma estrutura descontínua possibilitando a visualização do corpo de prova (manchas escuras circulares apontadas por setas amarelas).

### **Microespectroscopia Raman**

O biofilme bacteriano apresentou níveis significativos de autofluorescência no GC-, GC+ (CUR 5µg/ml) e fundo de autofluorescência mais baixos nos grupos PDTs (PDT 20 µg/ml-5,4J/cm<sup>2</sup>, PDT 20 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> e PDT 40 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup>), conforme mostra a figura 7.

Os grupos PDT 20 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> e PDT 40 µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> apresentaram espectros Raman quase idênticos de biofilme, com vários picos (434, 451, 697, 911, 927, 1106, 1122, 1140 e 1185 cm<sup>-1</sup>) desaparecendo do espectro. O espectro Raman após PDT 20µg/ml-5,4J/cm<sup>2</sup> apresentou um fundo de autofluorescência ainda mais baixo do que os biofilmes tratados com os protocolos de PDT acima discutidos, porém com o desaparecimento idênticos dos picos Raman do espectro (Figura 7).

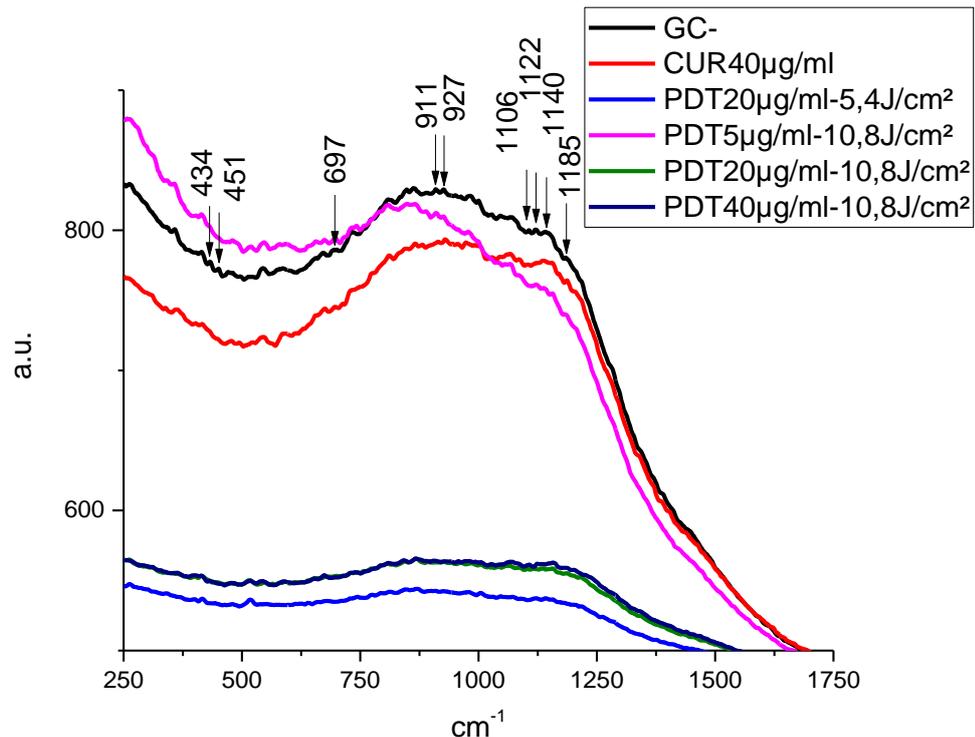


Figura 6- Autofluorescência e espectros Raman do biofilme de *P. aeruginosa* antes e após aPDT.

Fonte: Elaborada pela autora.

## Discussão

Para este estudo, a seleção do material para confecção dos corpos de prova, do microrganismo e sua forma de vida e do fotossensibilizador natural foi baseada na premissa de estabelecer desafios à efetividade antimicrobiana e antibiofilme da aPDT. Superfícies ásperas de resina acrílica conferem maior aderência ao biofilme, tornando-o mais resistentes a tratamentos antimicrobianos instituídos, quando comparados a biofilmes tratados de superfícies lisas<sup>18</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*, por ser uma bactéria Gram-negativa, com grande versatilidade metabólica e capacidade de formar biofilme densos, constitui verdadeira barreira à difusão e/ou ação de antimicrobiano e drogas fotoativas. Já a curcumina, trata-se de um FS de ocorrência natural, fotolável e de baixa solubilidade e estabilidade em meios aquosos, cuja

atividade em aPDT, até o presente momento, não foi avaliada frente a biofilme maduro de *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>2,19,20</sup>

### **Redução no crescimento bacteriano**

A terapia fotodinâmica tem sido relatada em diversos estudos como uma alternativa viável às falhas terapêuticas de antimicrobianos e desinfetantes. Diferentemente de antibióticos que agem em alvo específico, a aPDT consegue interagir com múltiplos alvos de ação como proteínas, lipídeos e ácido nucleico, impossibilitando o desenvolvimento de mecanismos de resistência antimicrobiana. Além desta vantagem, o direcionamento da luz para tratamento de lesões contaminadas, aplicação localizada do FS e um curto intervalo de tempo de interação entre a droga fotoativa e a luz, permitem uma maior absorção e efeitos citotóxicos para o microrganismo em detrimento das células saudáveis que permanecem praticamente isentas de efeitos colaterais.<sup>21</sup>

Ao considerar que a inativação fotodinâmica está baseada no tripé FS, luz e oxigênio molecular diversos estudos mostraram que a ausência ou uso isolado de um destes componentes comprometeria esta estrutura de modo a não produzirem efeitos citotóxicos em células-alvo.<sup>22,23</sup> Corroborando com esta premissa, nossa pesquisa constatou que o uso individual da luz azul nas três diferentes doses de energia e concentrações de curcumina não apresentaram diferenças estatísticas na viabilidade de *Pseudomonas aeruginosa* quando comparados a todos os grupos experimentais. Leite *et al*<sup>22</sup> ao avaliarem os efeitos da PDT mediada por curcumina para desinfecção oral também observaram que o uso isolado da luz azul não foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano da cavidade oral. Conclusões semelhantes tiveram Pucelik *et al*<sup>23</sup> e Hu *et al*<sup>24</sup> ao relataram que o emprego isolado de luz azul não interferiu na viabilidade das células microbianas estudadas, incluindo *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, respectivamente.

No entanto, diferentemente de nossos resultados, algumas pesquisas demonstraram que o uso isolado de FS ou luz podem produzir diferenças estatísticas no crescimento bacteriano. Possivelmente, estas variações de resultados em relação ao crescimento de microrganismo submetidos a diferentes protocolos de aPDT são

dependentes não só da estirpe estudada, característica inerente do FS, bem como da dose de energia da luz nos tratamentos.<sup>25,26</sup> A pesquisa *in vitro* de Karrer *et al*<sup>25</sup> demonstrou bem parte destas condições ao constataram que o uso isolado do 5 ácido-aminolevulínico (ALA) em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resultou em redução significativa do crescimento da cepa de *S. epidermidis*, enquanto o mesmo FS acelerou o crescimento de *S. aureus*. Sousa *et al*<sup>26</sup> ao analisarem os efeitos da luz azul 450 nm, nas fluências de 0 a 24 J/cm<sup>2</sup> em suspensões bacterianas verificaram efeito inibitório de crescimento de cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando expostas à luz azul na fluência maior que 6 J/cm<sup>2</sup> e de *E. coli* quando irradiada com luz azul na fluência maior que 3 J/cm<sup>2</sup>, mostrando uma maior resistência aos efeitos da luz entre as cepas de *S. aureus* e de *P. aeruginosa*.

O fato de bactérias Gram-negativas apresentarem diferenças na composição estrutural de suas membranas quando comparadas às bactérias Gram-positivas podem torná-las menos susceptíveis aos efeitos da inativação fotodinâmica.<sup>27</sup> Com membrana externa contendo lipopolissacarídeos carregados negativamente, *Pseudomonas aeruginosa* tem uma barreira estática que reduz a permeabilidade de moléculas neutras e aniônicas.<sup>10</sup>

Apesar de todos estes possíveis entraves, o presente estudo constatou a eficácia dos protocolos de aPDT mediada pelas três concentrações de curcumina frente a biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Ao se avaliar resultados das PDTs na menor concentração de curcumina, a PDT 5µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> apresentou reduções estatisticamente significativas no Log<sub>10</sub> de UFC/ml quando comparada a outros grupos experimentais (GC-, LED 5,4J/cm<sup>2</sup>, LED 10,8J/cm<sup>2</sup> e CUR 5µg/ml) e com grupo PDT 5µg/ml-3,24 J/cm<sup>2</sup>, demonstrando que, na menor concentração de curcumina, um maior tempo de irradiação, que é diretamente proporcional à densidade de energia, influenciou significativamente nos resultados entre dois grupos de PDTs. Constatação semelhante tiveram Hu *et al*,<sup>24</sup> em seu estudo sobre a eficácia da curcumina com EDTA, ativada por luz azul na inativação de *B. cepacia*, relatando que a redução da viabilidade da bactéria Gram-negativa foi dependente do tempo de irradiação, incrementando 5% de taxa de morte bacteriana quando se prolongou o tempo de irradiação em 10 minutos.

Ao analisar os resultados dos experimentos com PDT na concentração de 20 µg/ml de curcumina foi possível observar reduções estatisticamente significativas na contagem de UFC/ml, já a partir da dose de energia de 5,4 J/cm<sup>2</sup>, demonstrando que o aumento da concentração do FS produziu melhores resultados em detrimento do aumento da fluência. Em concordância com nossos resultados, Araújo *et al*<sup>8</sup> investigaram a susceptibilidade de cepas de *S. aureus* e *Lactobacillus acidophilus* a PDT com curcumina em diferentes concentrações (0,75, 1,5, 3,0, 4,0, e 5,0 g/L), ativadas por luz azul nas intensidades de 19 e 47,5 mW/cm<sup>2</sup> e fluência de 5,7 J/cm<sup>2</sup>, observando que aPDT reduziu significativamente o número de bactérias em ambas as intensidades quando a concentração de curcumina foi  $\geq$  a 4 g/L, sendo a concentração de 5,0 g/L a que apresentou os melhores percentuais de redução da viabilidade das bactérias pesquisadas.

Na concentração de 40 µg/ml de curcumina, a PDT 40µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> apresentou os melhores resultados do experimento, com redução de mais de 90% na contagem de UFC/ml, quando comparado aos GC-, GC+ (LED 5,4J/cm<sup>2</sup>, LED 10,8J/cm<sup>2</sup>) e PDTs (PDT 5µg/ml-3,24J/cm<sup>2</sup> e PDT 5µg/ml-5,4 J/cm<sup>2</sup>), evidenciando um efeito antimicrobiano dose-dependente da concentração de curcumina e da dose de energia. Além do grupo PDT 40µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup>, apenas a PDT 5µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup> apresentou redução estatisticamente significativa no crescimento bacteriano quando comparado a outro grupo PDT (PDT 5µg/m-3,24J/cm<sup>2</sup>), demonstrando que, quando da utilização de menor concentração de FS, a dose de energia é um fator capaz de alterar os resultados obtidos.

### **Estrutura de biofilme e mecanismos moleculares da curcumina.**

*Pseudomonas aeruginosa* pertence ao grupo I de homologia DNA-rRNA e sub-grupo de *Pseudomonas* fluorescentes devido à sua característica fenotípica de produção de pigmentos fluorescentes como a pioverdina, condição acentuada ao se adicionar curcumina ao biofilme bacteriano,<sup>3,29</sup> o que permitiu que o biofilme pesquisado fosse analisado por CSLM sem a necessidade de uso de marcadores.

As variáveis tempo de pré-irradiação, concentração de FS e dose de energia podem influenciar na penetração das drogas fotoativas em células de biofilme,

interferindo na inativação microbiana e na disruptura de biofilme.<sup>29-31</sup> O tempo de pré-irradiação de 5min somado à dose de energia mais alta mostraram-se suficientes para degradar a baixa concentração de curcumina na PDT 5µg/ml-10,8J/cm<sup>2</sup>, não sendo esta mesma condição observada nos grupos PDTs com maiores concentrações de curcumina, mas o mesmo tempo de pré-irradiação e dose de energia empregados, sem no entanto, deixar de produzir inativação fotodinâmica. Prova disto é a observação de menores agregados celulares com menor fluorescência que podem se traduzir como uma redução na viabilidade celular nos três grupos de terapia fotodinâmica estudados.<sup>32</sup>

Redução da autofluorescência do biofilme também foram observadas nas análises de espectro Raman, principalmente quando tratado com concentração mais alta de curcumina irradiada por dose de energia também mais alta, enfatizando que o efeito antimicrobiano observados nesta pesquisa foram dose-dependentes de concentração de curcumina e doses de energia. Em relação aos picos observados no espectro Raman, Jung *et al*<sup>16</sup> descrevem que, os picos em 927, 1106 e 1122 cm<sup>-1</sup> poderiam estar associados à vibração de alongamento por ligações glicosídicas simétricas (C-O-C) e respiração em anel de polissacarídeos. Os demais picos como 451, 911 e 1106 cm<sup>-1</sup> podem estar associados a aminoácidos.<sup>33</sup>

As EROs produzidas por aPDT têm como sítio de ação sobre os microrganismos, as biomoléculas proteína, lipídeo e ácido nucleico. Assim, como os picos que desapareceram após tratamento com curcumina irradiada com luz azul, parecem pertencer a polissacarídeos e proteínas, a ação da aPDT pode não estar circunscrita ao efeito antimicrobiano, já que agiu também sobre polissacarídeo, um importante componente da matriz extracelular do biofilme.<sup>16</sup> Os polissacarídeos são produzidos por um complexo de proteínas transmembranas e participam ativamente dos processos iniciais de formação do biofilme, favorecendo a aderência bacteriana, assim como nas fases de biofilme maduro, quando aumenta significativamente em quantidade para manter a estabilidade da matriz, proteger as células da microcolônia, reter nutrientes e água e favorecer o contato célula-célula, facilitando a intercomunicação dentro do biofilme.<sup>19</sup>

Em resumo, as análises das imagens de biofilme geradas por CSLM e a interpretação dos picos nos espectros Raman mostraram uma correlação entre si,

demonstrando que protocolos de aPDT estabelecidos para esta pesquisa produziram uma ação centrada no efeito disruptivo do biofilme estudado, possivelmente por agir diretamente em um importante e abundante componente da matriz extracelular de biofilmes, responsáveis por sua estruturação e estabilidade e por favorecer a proteção, comunicação e nutrição das células em microcolônia. Disruptura de biofilme também foi observada por Zangirolami *et al*<sup>29</sup> ao pesquisarem o efeito da PDT em biofilme em tubos endotraqueais, constatando que a curcumina ativada por luz azul de 450 nm foi capaz de causar o rompimento desta estrutura complexa, caracterizando seu efeito antibiofilme. Ronqui *et al*<sup>1</sup> ao pesquisarem o efeito individual da PDT e em associação com Ciprofloxacino contra biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* observaram que a aPDT utilizada foi capaz de alterar um biofilme compacto e homogêneo em uma estrutura esparsa e sem densidade, caracterizando a disruptura do biofilme de *E. Coli*. Possivelmente, este efeito foi o responsável por converter uma ação ineficaz do antibiótico em monoterapia, em um efeito antibacteriano com aproximadamente 7 logs de redução, quando a antibioticoterapia foi precedida pela terapia fotodinâmica. Além disso, o efeito disruptivo de biofilme apresentado possibilitou o uso de menores concentrações de antibiótico, o que na prática clínica reduziria o risco de efeitos colaterais e toxicidade.

Resistência antimicrobiana semelhante à de Gram-negativos também é observada em biofilme de fungos provavelmente pela constituição e tamanho da célula.<sup>30</sup> Hsieh *et al*<sup>34</sup> avaliaram os efeitos da curcumina ativada por luz LED e do Fluconazol em biofilme de *C. albicans* destacando que, embora houvesse uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular do fungo e uma disruptura do biofilme tratado com aPDT, o uso isolado desta terapia ou do antifúngico não foram capazes de eliminar eficientemente o fungo. No entanto, ao utilizarem concomitantemente as duas terapias constataram a completa eliminação de *C. albicans* aderente, ressaltando a influência que o biofilme também possui na resistência a antifúngicos, assim como o papel relevante que a PDT assume na disruptura desta estrutura, viabilizando então a inativação do fungo.

Provocar a disruptura de biofilme, com a dispersão de células bacteriana por meio da aPDT é uma estratégia promissora a ser implementada entre as medidas de controle das infecções por bactérias multirresistentes. Na forma planctônica, o resgate

da sensibilidade da bactéria aos antimicrobianos convencionais é comumente observado, além de possibilitar a redução de concentração de antibióticos administrados, com conseqüente diminuição dos efeitos colaterais e toxicidade do tratamento farmacológico.<sup>2,35</sup>

## **Conclusão**

Com o uso de técnica microbiológica e das ferramentas analíticas CSLM e microespectroscopia Raman podemos concluir que, após uma única sessão de tratamento mediado pela maiores concentrações de curcumina e doses de energia também mais altas delineadas para esta pesquisa, a aPDT foi capaz reduzir em mais de 90% o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a disruptura do biofilme seu mais importante efeito observado, mostrando-se uma possível estratégia a ser adotada como potencializadora da ação de antimicrobianos frente a biofilme.

## REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization – WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- 2 Costerton J W, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284** :1318-1322.
- 3 Palleroni NJ. *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2015.
- 4 Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ *et al*. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(5): 2352-61.
- 5 Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A *et al*. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(1): 317-23.
- 6 Araújo TSD, Rodrigues, PLF, Santos MS *et al*. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; **21**: 219-223.
- 7 Liu Y, Qin R, Zaat SAJ *et al*. Antibacterial photodynamic therapy: Overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of clinical and translational research* 2015; **1**(3):140-167.

- 8** Vassena C, Fenu S, Giuliani F *et al.* Photodynamic antibacterial and antibiofilm activity of RLP068/Cl against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* forming biofilms on prosthetic material. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **44** (1): 47-55.
- 9** Garcez AS, Núñez SC, Azambuja N JR *et al.* Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg* 2013; **31**(11):519-25.
- 10** Huang L, Xuan Y, Koide Y *et al.* Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an *in vitro* study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med* 2012; **44** (6): 490-9.
- 11** Ronqui MR, Aguiar-Coletti TM, De Freitas LM *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *J Photochem Photobiol B* 2016; **158**: 122-9.
- 12** Sperandio FF, Huang, YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent patents on anti-infective drug Discovery* 2013; **8**(2), 108–120.
- 13** Yin R, HAMBLIN MR. Antimicrobial photosensitizers: Drug discovery under the spotlight. *Curr Med Chem* 2015; **22**(18): 2159-85.
- 14** Amin RM, Hauser C, Kinzler I *et al.* Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: new approach. *Photochem. Photobiol. Sci* 2012; **11**(7): 1156-63.
- 15** Bodelón G, Montes-Garcia V, López-Puente V *et al.* Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nature materials* 2016; **15** (11): 1203-1211.

- 16** Jung GB, Nam SW, Choi S *et al.* Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biomed Opt Express* 2014; **28**;5(9):3238-51.
- 17** Pätzold R, Keuntje M, Anders-Von Ahlften A. New approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. *Anal Bioanal Chem* 2006; **386**(2):286-92.
- 18** Muscat Y *et al.* Investigation of acrylic resin disinfection using chemicals and ultrasound. *J Prosthodont.* **27**(5):461-468, Jun 2018.
- 19** Chao Y, zhang T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. *Anal Bioanal Chem.* 2012, **404**(5): 1465-75.
- 20** Cooksey, C. J. Turmeric: old spice, new spice. *Biotechnic & Histochemistry* 2017; **92**(5):309-314.
- 21** Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* 2016; **33**:67-73.
- 22** Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN *et al.* Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomedicine and laser surgery* 2014; **32**(11), 627-32.
- 23** Pucelik B, Paczyński R, Dubin G *et al.* Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies. *PLoS One* 2017;**12**(10):e0185984.
- 24** Hu J, Lin S, Tan BK *et al.* Photodynamic inactivation of *Burkholderia cepacia* by curcumin in combination with EDTA. *Food Res Int.* 2018; **111**:265-271.

- 25** Karrer S, Szeimies RM, Ernst S *et al.* Photodynamic inactivation of staphylococci with 5-aminolaevulinic Acid or photofrin. *Lasers Med Sci.* 1999; **14**(1):54-61.
- 26** Sousa NT, Santos MF, Gomes RC *et al.* Blue Laser Inhibits Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photomed Laser Surg.* 2015; **33**(5):278-82.
- 27** Bourré L, Giuntini F, Eggleston I *et al.* Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; **9**(12):1613-20. doi: 10.1039/c0pp00146e. Epub 2010 Oct 8.
- 28** Araújo NC, Menezes RF, Carneiro VSM *et al.* Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. *Photomed Laser Surg* 2017; **35**(5):259-263.
- 29** Zangirolami AC, Inada, NM, Bagnato VS *et al.* Biofilm destruction on endotracheal tubes by photodynamic inactivation. *Infect Disord Drug Targets* 2018; **18**(3):218-223.
- 30** Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN *et al.* Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol* 2013; **58**(2):200-10.
- 31** Santezi C, Reina BD, Dovigo, LN. Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections- A review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; **21**:409-415.
- 32** Wong C, Ha NP, Pawlowski ME *et al.* Differentiating between live and dead *Mycobacterium smegmatis* using autofluorescence. *Tuberculosis (Edinb).* 2016; **101**S:S119-S123.

**33** De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P *et al.* Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J.Raman Spectrosc.* 2007; **38**:1133-1147.

**34** Hsieh YH, Zhang JH, Chuang WC *et al.* An *in vitro* study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; **19**(2), pii:E337.

**35** Roy R, Tiwari M, Donelli G *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 2018; **9**(1):522-554.